



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

Determinación de la eficacia del ensayo HRM para la detección del número de copias del alelo resistente del gen *Ryadg* de *Solanum tuberosum* grupo Andigenum

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Laura Nadia Jara VIDALÓN ORRILLO

ASESORES

Ricardo Jaime DESCAILLEAUX DULANTO

Maria del Rosario HERRERA MONTOYA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vidalón, L. (2019). *Determinación de la eficacia del ensayo HRM para la detección del número de copias del alelo resistente del gen Ryadg de Solanum tuberosum grupo Andigenum*. Tesis para optar grado de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

METADATOS COMPLEMENTARIOS

1. Código ORCID del autor : 0000-0001-9169-7111

2. Código ORCID del asesor :

0000-0002-0863-1945 - RICARDO JAIME DESCAILLEAUX DULANTO

0000-0002-2589-8289 - MARIA DEL ROSARIO HERRERA MONTOYA

3. DNI del autor : 42888837

4. Grupo de investigación : no aplica

5. Institución que financia parcial o total la investigación: Este proyecto se ha desarrollado con fondos del Centro Internacional de la Papa (CIP).

6. Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación:

Avenida La Molina 1895, La Molina Apartado 1558, Lima 12, Peru

Latitud : -12.077497| Longitud : -76.947217

7. Año o rango de años: 2013-2017



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú. Decana de América)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 166-UPG-FCB-2018

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 08:05 horas del día 28.6.2019 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca	e integrado por
Dr. Enrique Walter Mamani Zapana	(Miembro)
Dr. Miguel Machahua González	(Miembro)
Dr. Jorge Luis Ramírez Malaver	(Miembro)
Dr. Ricardo Jaime Desacailleaux Dulanto	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Doña **LAURA NADIA JARA VIDALÓN ORRILLO**.

Después de darse lectura al Expediente N° 166-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL ENSAYO HRM PARA LA DETECCIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL ALELO RESISTENTE DEL GEN *Ry_{adg}* DE *Solanum tuberosum* GRUPO ANDIGENUM”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú. Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Excelente con la nota de 19*

A continuación el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en la Maestría de Investigación en Biología Molecular a la Bachiller **LAURA NADIA JARA VIDALÓN ORRILLO**

Siendo las... *9:30* se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 28 días del mes de junio del año 2019.

.....
Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca
Profesor Principal a D.E.
PRESIDENTE
REGINA N° 14730

.....
Dr. Ricardo Jaime Descailleaux Dulanto
Profesor Principal.
ASESOR
REGINA N° 2977

.....
Dr. Enrique Walter Mamani Zapana
Profesor Principal a D. E.
MIEMBRO
REGINA N° 15757

.....
Dr. Miguel Machahua Gonzalez
Profesor Auxiliar a T. C.
MIEMBRO
REGINA N° 13972

.....
Dr. Jorge Luis Ramírez Malaver
MIEMBRO
Profesor Auxiliar a T. C.
REGINA N° 15107

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) por permitirme desarrollar este trabajo.

Al Dr. Marc Ghislain que me dio la oportunidad de trabajar en este proyecto. A la Mg. María del Rosario Herrera, por su confianza, por su guía durante todo el transcurso de este trabajo; por compartir conmigo su experiencia y conocimientos.

A mi asesor de la Universidad, el Dr. Jaime Descailleaux Dulanto, por su tiempo, interés y recomendaciones.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, especialmente a José Rodríguez y Luciano Fernández por ayudarme siempre con mucho entusiasmo y dedicación.

A mi padre, a mi hermano y a Giancarlo Guillén Garrido por siempre darme consejos y ánimos para concluir esta tesis.

A mi madre y a mi padre

RESUMEN

El gen *Ry_{adg}* de *Solanum tuberosum* grupo Andigenum es una fuente de resistencia extrema al virus Y de la papa (PVY, del inglés Potato Virus Y). Es utilizado por mejoradores genéticos buscando prevenir infecciones y evitar pérdidas en la producción. El gen *Ry_{adg}* no ha sido aislado, pero se han encontrado varios marcadores moleculares fuertemente ligados al gen. El locus del marcador molecular M6 presenta un alelo estrictamente asociado con la resistencia extrema a PVY, y representa el locus más informativo para caracterizar al gen *Ry_{adg}*. La identificación de individuos con más de un alelo de resistencia de este gen es útil ya que pueden transmitir la resistencia a una mayor proporción de su progenie.

En el presente trabajo se evaluó la eficacia del ensayo molecular HRM (High Resolution Melting; en español, análisis de curvas de disociación de alta resolución) para la detección del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*. Para lo cual se analizaron dos poblaciones resultantes del cruce de genotipos con distinto número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*: la población CT y la población TL. Se realizó el ensayo HRM con la sonda y los iniciadores diseñados a partir de las secuencias de los alelos del marcador molecular M6. Finalmente, se utilizó la prueba de bondad de ajuste del chi-cuadrado para comprobar que la segregación observada del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*, corresponde a la segregación esperada.

El ensayo HRM diferencia los alelos susceptibles y resistente del locus *Ry_{adg}*, representados por dos picos bien definidos. Además, se distinguen cuatro genotipos: simplex, dúplex, triplex y nuliplex. Se esperaba que la segregación observada coincidiera con la teórica esperada; sin embargo, la prueba del chi-cuadrado indica que los resultados no se ajustan a esta segregación. Esta discrepancia podría ser explicada por un efecto adverso sobre el desarrollo de la planta, causado por la acumulación del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*. En conclusión, el ensayo HRM es eficaz para la detección del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.

Palabras clave: resistencia extrema, PVY, papa, HRM, *Ry_{adg}*

ABSTRACT

The *Ry_{adg}* gene from *Solanum tuberosum* Andigenum group is a source of extreme resistance to the Potato virus Y (PVY). It is used by plant breeders seeking to prevent infections and to avoid loss of production. Up to now, the *Ry_{adg}* gene has not been isolated, but molecular markers tightly linked to this gene have been found. The locus of the M6 molecular marker has an allele strictly associated with the extreme resistance to PVY, then it represents the most informative locus to characterize *Ry_{adg}*. The identification of genotypes with more than one resistance allele is useful, because these genotypes could inherit their resistance to a bigger part of its progeny.

The present work evaluates the efficacy of the High Resolution Melting assay (HRM) to detect the number of copies of the *Ry_{adg}* resistant allele. For which, two populations were developed using parental genotypes with different number of copies of the resistant allele of the *Ry_{adg}* gene: CT and TL populations. Next, they were evaluated with the HRM assay, which uses the primers and the probe designed from the allele sequences of the M6 molecular marker. Finally, a goodness of fit chi-square test was used to test if the segregation of the *Ry_{adg}* resistant allele in the progeny fit the expected segregation.

The HRM assay can distinguish between the susceptible and resistant alleles from the *Ry_{adg}* locus, displaying them as two well defined peaks. Furthermore, four groups could be observed, which correspond to simplex, duplex, triplex and nulliplex genotypes. It was expected that the observed proportions match the theoretical expected proportion; however, the chi-square test indicates that the observed results do not fit to this proportion. This discrepancy could be explained by an adverse effect over the development of the plant, caused by the accumulation of the number of copies of the *Ry_{adg}* resistant allele. In conclusion, the HRM assay is effective to detect the number of copies of the *Ry_{adg}* resistant allele.

Key words: extreme resistance, PVY, potato, HRM, *Ry_{adg}*

CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 La papa	3
2.2 El Virus Y de la papa (PVY)	4
2.3 Resistencia a PVY	5
2.4 Marcadores moleculares para el gen <i>Ry</i>	7
2.5 El alelo resistente del gen <i>Ry_{adg}</i>	8
2.6 Análisis de curvas de disociación de alta resolución (HRM, de las siglas en inglés de High Resolution Melting)	8
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Obtención de poblaciones derivadas de parentales con distinto número de copias del alelo resistente del gen <i>Ry_{adg}</i> .	14
4.2 Extracción de ADN	15
4.3 Ensayo molecular HRM para la detección del número de copias del alelo resistente del gen <i>Ry_{adg}</i>	15
4.4 Prueba de bondad de ajuste del chi-cuadrado	21
4.5 Ensayo de resistencia a PVY	22
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1 Obtención de poblaciones derivadas de parentales con distinto número de copias del alelo resistente del gen <i>Ry_{adg}</i> .	23
5.2 Extracción de ADN	23

5.3	Ensayo molecular HRM para la detección del número de copias del alelo resistente del gen <i>Ry_{adg}</i> .	24
5.4	Prueba de bondad de ajuste del chi-cuadrado	29
VI.	CONCLUSIONES	35
VII.	RECOMENDACIONES	36
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
IX.	ANEXOS	43

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism; en español, Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados.
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; en español, Secuencia polimórfica amplificada y cortada.
CIP	Centro Internacional de la Papa
CT	Población cv. Costanera x TXY.2
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay; en español, Sandwich de doble anticuerpo - Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.
ER	Extreme resistant; en español, resistencia extrema
HR	Hypersensitive resistance; en español, resistencia hipersensible
HRM	High Resolution Melting; en español, análisis de curvas de disociación de alta resolución.
M6R	Alelo resistente del marcador molecular M6
M6S1	Alelo susceptible 1 del marcador molecular M6
M6S2	Alelo susceptible 2 del marcador molecular M6
M6S3	Alelo susceptible 3 del marcador molecular M6
M6S4	Alelo susceptible 4 del marcador molecular M6
<i>Ny</i>	Gen dominante de respuesta hipersensible al Virus Y de la papa.
PCR	Polymerase Chain Reaction; en español, Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PLRV	Potato Leaf Roll Virus; en español, Virus del Enrollamiento de la papa.
PVA	Potato virus A; en español, Virus A de la papa
PVV	Potato virus V; en español, Virus V de la papa
PVY	Potato virus Y; en español, Virus Y de la papa
PVY ^o	Cepa común del Virus Y de la papa
PVY ^C	Cepa que corresponde al tipo C del Virus Y de la papa
PVY ^N	Cepa necrótica del Virus Y de la papa
<i>Rsa</i> I	Enzima de restricción derivada de <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> .
<i>Ry</i>	Gen dominante de resistencia extrema al Virus Y de la papa

<i>Ry_{adg}</i>	Gen dominante de resistencia extrema al Virus Y de la papa, derivado de <i>Solanum tuberosum</i> grupo Andigenum.
<i>Ry_{sto}</i>	Gen dominante de resistencia extrema al Virus Y de la papa, derivado de <i>Solanum stoloniferum</i> .
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region; en español, regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas.
SNPs	Single nucleotide polymorphism; en español, polimorfismo de un solo nucleótido.
TL	Población TXY.2 x LBr-43
T _m	Melting temperature; en español, temperatura de disociación.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1	Síntomas de infección por PVY 5
Figura 2	Procedimiento HRM 11
Figura 3	Dosaje alélico 12
Figura 4	Alineamiento de las secuencias de los alelos del marcador molecular M6. 16
Figura 5	Gráfico de los datos crudos obtenidos en el equipo de HRM. 18
Figura 6	Flujo del análisis de datos en LightScanner Instrument & Analysis Software versión 2.0.0.1331. 20
Figura 7	Segregación esperada para el cruce F1 de cv. Costanera (Rrrr) x TXY.2 (RRrr). 21
Figura 8	Segregación esperada para el cruce F1 de TXY.2 (RRrr) x LBr-43 (rrrr). 22
Figura 9	Picos de disociación de los genotipos parentales. 25
Figura 10	Análisis HRM en una parte de la población cv. Costanera x TXY.2. 27
Figura 11	Perfiles de los diferentes dosajes alélicos del alelo resistente (M6R) encontrados en la población cv. Costanera x TXY.2. 28
Figura 12	Perfiles de los diferentes dosajes alélicos del alelo resistente (M6R) encontrados en la población TXY.2 x LBr-43. 28
Figura 13	Pedigrí del clon TXY.2. 30
Figura 14	La segregación esperada para el cruce F1 de cv. Costanera (Rrrr) x TXY.2 (RRrr) según la hipótesis 1 es 1N:5S:5D. 30
Figura 15	La segregación esperada para el cruce F1 de cv. Costanera (Rrrr) x TXY.2 (RRrr) según la hipótesis 2 es 1N:5S:4D. 31
Figura 16	La segregación esperada para el cruce F1 de TXY.2 (RRrr) x LBr-43 (rrrr) según la hipótesis 2 es 1N:4S. 32

LISTA DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Proporciones genotípicas teóricas de todos los posibles cruces entre progenitores nuliplex, simplex, dúplex, triplex o cuádruplex.	8
Tabla 2	Preparación de la solución maestra para el PCR asimétrico.	17
Tabla 3	Condiciones de amplificación para el PCR asimétrico.	17

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa es uno de los más importantes a nivel mundial y el virus Y de la papa (PVY) es uno de sus principales patógenos. Este virus es transmitido naturalmente por áfidos. PVY causa pérdidas en la producción, daños al tubérculo y disminución de la cosecha de semillas. La producción puede verse afectada hasta un 80% cuando variedades susceptibles son infectadas o en co-infecciones con otros virus (Valkonen *et al.*, 1998). Además, la infección puede transmitirse cuando los tubérculos son utilizados como semilla. Las medidas utilizadas para controlar la infección producen pérdidas económicas debido a los altos costos que implican; estas medidas incluyen esquemas de producción y certificación de semilla de papa (Solomon-Blackburn y Barker, 2001a). También se utilizan insecticidas para eliminar las poblaciones de áfidos; sin embargo, esto es ineficaz y costoso, además; los insecticidas implican riesgos debido a que contaminan el medio ambiente y que los residuos que quedan en los tubérculos pueden afectar la salud de los consumidores. Otro aspecto a tomar en consideración es que los áfidos desarrollan resistencia ante los insecticidas. Una solución económica y ambientalmente más aceptable es el uso de variedades resistentes (Thieme y Thieme, 2005).

Se han descrito genes de resistencia a PVY en diversas especies de papa y estos han sido ubicados en diferentes cromosomas. Estos genes de resistencia pueden provocar respuestas de resistencia extrema (ER, del inglés extreme resistance) o de hipersensibilidad (HR, del inglés hypersensitive resistance). En la respuesta de resistencia extrema las plantas no muestran síntomas y el virus no es detectado en las pruebas de diagnóstico. Mientras que en una respuesta de hipersensibilidad se evita la dispersión del virus mediante un mecanismo de necrosis; sin embargo, el virus puede ser detectado en las hojas infectadas. La ventaja del uso de genes de resistencia extrema frente a los de hipersensibilidad es que estos protegen a la planta ante todas las cepas de PVY, en cambio los genes de hipersensibilidad son específicos para una determinada cepa del virus.

Ry_{adg} es un gen dominante que confiere resistencia extrema a PVY y está ubicado en el cromosoma XI de *Solanum tuberosum* grupo Andigenum (Hamalainen *et al.*, 1997). La secuencia de este gen aún no ha sido aislada, pero existen marcadores

moleculares ligados a este gen, uno de ellos es el marcador M6. Herrera *et al.*, (2018) describieron diferentes alelos para este marcador: un alelo resistente (M6R) ligado al alelo resistente del gen *Ry_{adg}* y alelos de susceptibilidad (M6S1, M6S2, M6S3 y M6S4). Entonces, el uso del marcador molecular M6 permite determinar de forma indirecta la presencia del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.

En los programas de mejoramiento se busca obtener progenitores con más de una copia del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*, debido a que estos progenitores son capaces de transmitir la resistencia en mayor frecuencia a su progenie que un progenitor con un solo alelo resistente (Mendoza *et al.*, 1996). La detección del número de copias del alelo resistente en un determinado genotipo requiere la obtención de una población F1 mediante una cruce de prueba y una prueba fenotípica de resistencia a PVY en esta población. Así, comparando la segregación observada y la esperada de los genotipos se puede indicar si el genotipo contiene cero, una, dos, tres o cuatro copias del alelo resistente. Este procedimiento demanda tiempo y recursos económicos, además es difícil realizar estos experimentos a gran escala. Por lo cual, una prueba sencilla y rápida como el análisis de curvas de disociación de alta resolución utilizando el marcador molecular M6 representa una buena opción para detectar fácilmente genotipos con más de una copia del alelo resistente del gen *Ry_{adg}* y así poderlos utilizar en los programas de mejoramiento.

II. ANTECEDENTES

2.1. La papa

A nivel mundial, la papa es el tercer cultivo más importante (FAO, 2013 en Spooner *et al.*, 2014). Pertenece a la familia Solanaceae, al género *Solanum*, sección *Petota*. Se reconocen cuatro especies cultivadas y 107 especies silvestres de papa (Spooner *et al.*, 2014). Tienen un número base de 12 cromosomas ($x = 12$), pudiendo ser diploides hasta hexaploides. Según Spooner *et al.*, (2014) las papas cultivadas se clasifican en cuatro especies 1) *Solanum tuberosum* (grupo Andigenum y grupo Chilotanum), 2) *S. ajanhuiri*, 3) *S. juzepczukii* y 4) *S. curtilobum*.

Solanum tuberosum grupo Andigenum contiene especies diploides, triploides y tetraploides. Se propone que el grupo Andigenum se originó a partir de un solo evento de domesticación de especies silvestres diploides del complejo *S. brevicaulle* y que los genotipos triploides y tetraploides del grupo Andigenum pudieron tener múltiples orígenes (Spooner *et al.*, 2014).

La papa puede reproducirse asexualmente, mediante tubérculos, brotes o yemas, y también sexualmente, con la producción de gametos femeninos y masculinos que se combinan y recombinan originando la variabilidad genética. Mediante la meiosis, se producen gametos en los cuales se ha reducido a la mitad el número de cromosomas. En el caso de una especie diploide ($2x$) los gametos producidos tendrán sólo un juego de cromosomas (n) y en el caso de una especie tetraploide ($4x$) los gametos tendrán dos juegos de cromosomas ($2n$). Los gametos $2n$ facilitan la poliploidización y han permitido la evolución de las diversas especies de papa. Los poliploides pueden originarse por el fusionamiento de los gametos $2n$ (poliploidización sexual) o por una duplicación de los cromosomas somáticos (poliploidización asexual) (Orrillo y Bonierbale, 2009). La poliploidización asexual puede ocurrir como resultado de una endomitosis, una fusión nuclear o una c-mitosis (utilizando métodos artificiales) (De Storme y Geelen, 2013).

2.2. El Virus Y de la papa (PVY)

El virus Y de la papa, junto al virus del Enrollamiento de la papa (PLRV, del inglés Potato Leaf Roll Virus) es uno de los virus más importantes que afecta a este tubérculo. Forma parte de la Familia Potyviridae junto con los virus PVA (Virus A de la papa) y PVV (Virus V de la papa). El Virus Y de la papa también causa infección en otros cultivos de Solanáceas: el tomate (*Solanum lycopersicum*), el pimiento (*Capsicum* spp.) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Singh *et al.*, 2008). También son susceptibles ciertas especies de quenopodiáceas y leguminosas (Hooker, 1980).

Los diferentes aislamientos del virus Y de la papa se clasifican en grupos de cepas que pueden diferenciarse de acuerdo a los síntomas que producen en diferentes cultivares de papa, tabaco y otros hospedantes; y a su capacidad para provocar una respuesta hipersensible en cultivares de papa con genes de resistencia de hipersensibilidad. También, se han utilizado pruebas serológicas y moleculares para su clasificación (Singh *et al.*, 2008). Los tres grupos principales de cepas del virus Y de la papa son: PVY^o (cepa común), PVY^N (cepa necrótica o de la necrosis de la nervadura del tabaco) y PVY^C (cepa que corresponde al tipo de virus C) (Singh *et al.*, 2008). PVY^o tiene distribución mundial. PVY^C está distribuido en Sudamérica, Norte América, Europa, India, Nueva Zelanda y Australia. PVY^N se encuentra en Sudamérica, Norte América, Europa, Nueva Zelanda y África.

PVY es transmitido en la naturaleza por áfidos en una forma no persistente; es decir, los áfidos adquieren el virus y este permanece viable por poco tiempo. Las especies *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* son los vectores naturales más importantes (Salazar, 1996). PVY también puede ser transmitido por vía mecánica o por contacto, mediante el uso de herramientas en la agricultura o por inoculación experimental. La adquisición del virus donde antes no existía es llamada infección primaria. PVY también es comúnmente transmitido mediante la siembra de tubérculos guardados a partir de plantas infectadas; estableciéndose una infección secundaria (Salazar, 1996).

La severidad de los síntomas de PVY puede variar en relación con la cepa y la variedad del cultivo, desde un mosaico muy suave hasta una necrosis severa y muerte (Salazar, 1996). Figura 1.

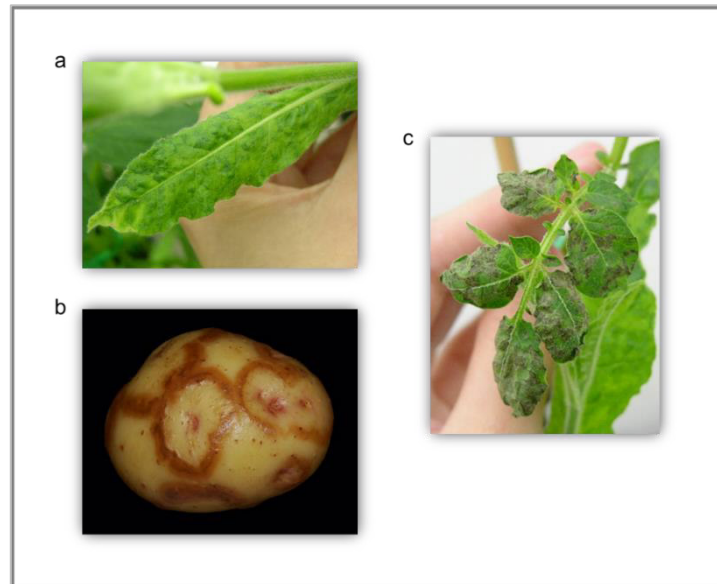


Figura 1. Síntomas de infección por PVY. (a) mosaico, (b) necrosis en tubérculo y (c) necrosis en hojas.

2.3. Resistencia a PVY

La resistencia es la capacidad de una planta para impedir o controlar una enfermedad (Thieme y Thieme, 2005). El desarrollo de genotipos resistentes a PVY es una de las mejores estrategias de control porque puede ser transmitida a la progenie y evita el uso de pesticidas.

La respuesta de defensa de una planta ante una infección por PVY puede ser de dos tipos: a) respuesta hipersensible o b) respuesta de resistencia extrema.

La hipersensibilidad (HR) es la respuesta que genera una reacción de necrosis en el sitio de infección o una necrosis sistémica (Solomon-Blackburn y Barker, 2001b), evitando la dispersión de la infección. El virus puede ser detectado en las hojas infectadas. Este tipo de resistencia es monogénica (determinada por un solo gen)

y está determinada por los genes dominantes *Ny*, los cuales responden específicamente ante una sola cepa del virus (Cockerham, 1970).

Se han descrito diversas fuentes de hipersensibilidad, entre ellos *Ny_{tbr}* en *S. tuberosum* (Celebi –Toprak *et al.*, 2002), *Ny_{adg}* en *S. tuberosum* grupo Andigenum (Valkonen *et al.*, 1994a), *Ny_{dms}* en *S. demissum* (Cockerham, 1970), *Ny_{chc}* en *S. chacoense* (Cockerham, 1970), *Ny-1* en el cultivar Rywall (Szajko *et al.*, 2008), *Ny-Smira* en el cultivar Sárpo Mira (Tomczynska *et al.*, 2014), *Ny-2* en el cultivar Romula (Szajko *et al.*, 2014), y *Ny_{(o,n)sto}* (van Eck *et al.*, 2017).

En una respuesta de resistencia extrema (ER) las plantas no muestran síntomas o puede desarrollarse una necrosis limitada después de la inoculación del virus (Solomon-Blackburn y Barker, 2001b). El título del virus es extremadamente bajo (Valkonen, 1994b) y no es detectado mediante pruebas estándar como ELISA o por retroinoculación a plantas susceptibles indicadoras (Barker, 1996). La resistencia extrema es una resistencia de tipo monogénico y es conferida por los genes dominantes *Ry*, que confieren resistencia ante todas las cepas de PVY (Valkonen, 1994b).

Los genes de resistencia extrema han sido reportados en *S. tuberosum* grupo Andigenum (*Ry_{adg}*) (Muñoz *et al.*, 1975; Gálvez *et al.*, 1992), en *S. stoloniferum* (*Ry_{sto}* y *Ry-f_{sto}*) (Cockerham, 1970 y Flis *et al.*, 2005), en *S. hougasii* (*Ry_{hou}*) (Cockerham, 1970) y en *S. chacoense* (*Ry_{chc}*) (Hosaka *et al.*, 2001).

El gen *Ry_{adg}* confiere resistencia estable porque actúa ante todas las cepas de PVY, incluido PVY^{NTN} (Mihovilovich *et al.*, 1997, Le Romanecer y Nedellec, 1997). Algunos clones de *S. tuberosum* grupo Andigenum poseen genes de resistencia a PVY y han sido usados en el Centro Internacional de la Papa (CIP) dentro de su programa de mejoramiento para resistencia a virus (Mihovilovich, 1996). Las variedades Costanera y Tacna se obtuvieron dentro de este programa y se caracterizan por estar adaptadas a la árida costa peruana. Así también, se han desarrollado clones dúplices y tríplexes para *Ry_{adg}* (Mihovilovich *et al.*, 1997; 2000).

2.4. Marcadores moleculares para el gen *Ry*

El gen *Ry_{adg}* fue mapeado al cromosoma XI de la papa (Hamalainen *et al.*, 1997). Kasai *et al.*, (2000) diseñaron el marcador molecular SCAR RYSC3 de 321 pb, ligado al gen *Ry_{adg}*. El marcador RYSC3 fue probado en genotipos tetraploides y diploides con diferente genealogía y fue específico para los genotipos con *Ry_{adg}*. Este marcador no fue detectado en otros genotipos con genes *Ry* no derivados de *S. tuberosum* grupo Andigenum (Kasai *et al.*, 2000).

Al igual que *Ry_{adg}*, el gen *Ry_{sto}* también fue localizado en el cromosoma XI (Brigneti *et al.*, 1997). Los marcadores moleculares AFLP M17, M45, M5 y M6 están estrechamente ligados al gen *Ry_{sto}*. Los marcadores M45 y M5 co-segregan con *Ry_{sto}* y los marcadores M17 y M6 están a cada lado y separados de *Ry_{sto}* por un solo evento de recombinación (0.3 cM). A partir de las secuencias de los marcadores AFLP M6 y M45 se desarrollaron los marcadores moleculares: SCAR M45 y CAPS M6 (Brigneti *et al.*, sin publicar). El marcador CAPS M6 amplifica una banda de 1100 pb. El corte de esta banda con la enzima de restricción *RsaI* genera diferentes patrones: en el caso del alelo resistente (presente solamente en genotipos resistentes) se obtienen dos bandas una de 800 pb y otra de 300 pb; el corte de un alelo susceptible produce dos bandas de 600 pb y 500 pb. Una banda de 1100 pb representa otro alelo susceptible que no es digerido por *RsaI*.

Estudios realizados por Herrera *et al.*, (2018) muestran que los marcadores M6 y M45 están ligados al gen *Ry_{adg}* y la distancia entre estos es de 0.05 cM (Jara Vidalón, 2010). Herrera *et al.*, (2018) rediseñaron los iniciadores M6 y M45 a partir del análisis de varios cultivares de papa, produciendo los marcadores moleculares M6F1R4 y M45F1R1. Adicionalmente, usando la secuencia del marcador M6, diseñaron iniciadores y sondas no marcadas para ser utilizados en un ensayo HRM que permita la detección del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.

2.5. El alelo resistente del gen *Ry_{adg}*

Dependiendo del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*, los genotipos con cero, una, dos, tres o cuatro copias son llamados nuliplex, simplex, dúplex, triplex o cuádruplex, respectivamente. En los programas de mejoramiento de papa se busca obtener progenitores con más de un alelo resistente, ya que estos son capaces de transmitir la resistencia a su progenie en mayor frecuencia que un progenitor con un solo alelo resistente (Mendoza *et al.*, 1996). Las proporciones esperadas al realizar los cruces se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Proporciones genotípicas teóricas de todos los posibles cruces entre progenitores nuliplex, simplex, dúplex, triplex o cuádruplex (Brown *et al.*, 2014).

Cruce	Nuliplex (N)	Simplex (S)	Dúplex (D)	Triplex (T)	Cuádruplex (C)
Nuliplex (rrrr)	Todos N				
Simplex (Rrrr)	1S : 1N	1D : 2S : 1N			
Dúplex (RRrr)	1D : 4S : 1N	1T : 5D : 5S : 1N	1C : 8T : 18D : 8S : 1N		
Triplex (RRRr)	1D : 1S	1T : 2D : 1S	1C : 5T : 5D : 1S	1C : 2T : 1D	
Cuádruplex (RRRR)	Todos D	1T : 1D	1C : 4T : 1D	1C : 1T	Todos C

El término dosaje alélico se refiere al número de copias de un determinado alelo para un locus o gen de interés. En el caso de la papa tetraploide el dosaje alélico para un determinado alelo puede ser desde 0 copias (nuliplex) a 4 copias (cuádruplex) (Brown *et al.*, 2014).

2.6. Análisis de curvas de disociación de alta resolución (HRM, de las siglas en inglés de *High Resolution Melting*)

El análisis de curvas de disociación de alta resolución se basa en la detección de la temperatura de disociación (T_m , del inglés melting temperature), que es la temperatura en la cual dos hebras complementarias de ADN se separan. El equipo de HRM expone a la muestra a un incremento gradual de la temperatura, usualmente desde 45 a 95 °C; mientras captura con una cámara la disminución de

la emisión de la fluorescencia del elemento intercalado entre las hebras de ADN conforme aumenta la temperatura y las hebras se separan.

De Koeyer *et al.*, (2010) describe la utilidad del ensayo HRM para la genotipificación y la detección de variantes en papas diploides y tetraploides. Una de las aplicaciones que describe es la utilización de sondas no marcadas bloqueadas en su extremo 3' para la detección del número de copias de un determinado alelo. Concluye que en una situación bialélica (papa tetraploide) el análisis HRM con sonda no marcada puede discriminar los cinco genotipos posibles: aaaa, Aaaa, AAaa, AAAa, AAAA.

El ensayo HRM con el uso de sonda no marcada involucra:

- El diseño de los iniciadores y la sonda. Los iniciadores no deben estar localizados sobre regiones polimórficas y la sonda no marcada debe contener el polimorfismo a evaluar y estar bloqueada en su extremo 3' para impedir la amplificación (Figura 2A).
- Una PCR asimétrica donde uno de los iniciadores está en mayor cantidad y una de las hebras se produce en exceso. A esta hebra en exceso se une la sonda no marcada (Figura 2B y 2C). Se estandarizan las condiciones de PCR y se escoge una temperatura en la cual se observe la amplificación del producto deseado en geles de agarosa tanto en individuos susceptibles como resistentes. En la reacción de PCR se utiliza el agente fluoróforo LC Green, que se intercala entre las hebras dobles de ADN y cuya fluorescencia es detectada por el equipo de HRM LightScanner (Idaho Technology Inc.). Zhou *et al.*, (2004) menciona que la ventaja de usar LC Green I ante otros fluoróforos es que puede ser usado a una gran concentración, la cual satura el producto de PCR pero que no inhibe la amplificación. Se realiza un paso adicional de denaturación del producto amplificado a 94 °C por 30 segundos y sometimiento a una baja temperatura rápidamente para permitir la formación de un híbrido entre la hebra en exceso del producto de PCR y la sonda.

- Lectura en el equipo de HRM: Se somete al producto de PCR a un aumento de la temperatura y se detecta los cambios en la emisión de la fluorescencia. Conforme aumenta la temperatura ocurre la disminución de fluorescencia. Estos datos son analizados utilizando el software del equipo.

Los dosajes alélicos se pueden distinguir por la altura de los picos de disociación (Figura 3), la cual representa la cantidad de dobles hebras unidas a la sonda que son disociadas con el aumento de la temperatura. Es decir, un genotipo simplex para determinado alelo tendrá un pico de menor altura que un genotipo dúplex para el mismo alelo debido a que el genotipo dúplex al tener el doble de uniones sonda-ADN perderá una cantidad mayor de fluorescencia al irse disociando la sonda del ADN.

Montgomery *et al.*, (2007) indica que el uso de sondas no marcadas permite el análisis del híbrido sonda-hebra en exceso del producto de PCR y también del producto de PCR al mismo tiempo, por tener diferentes temperaturas de disociación.

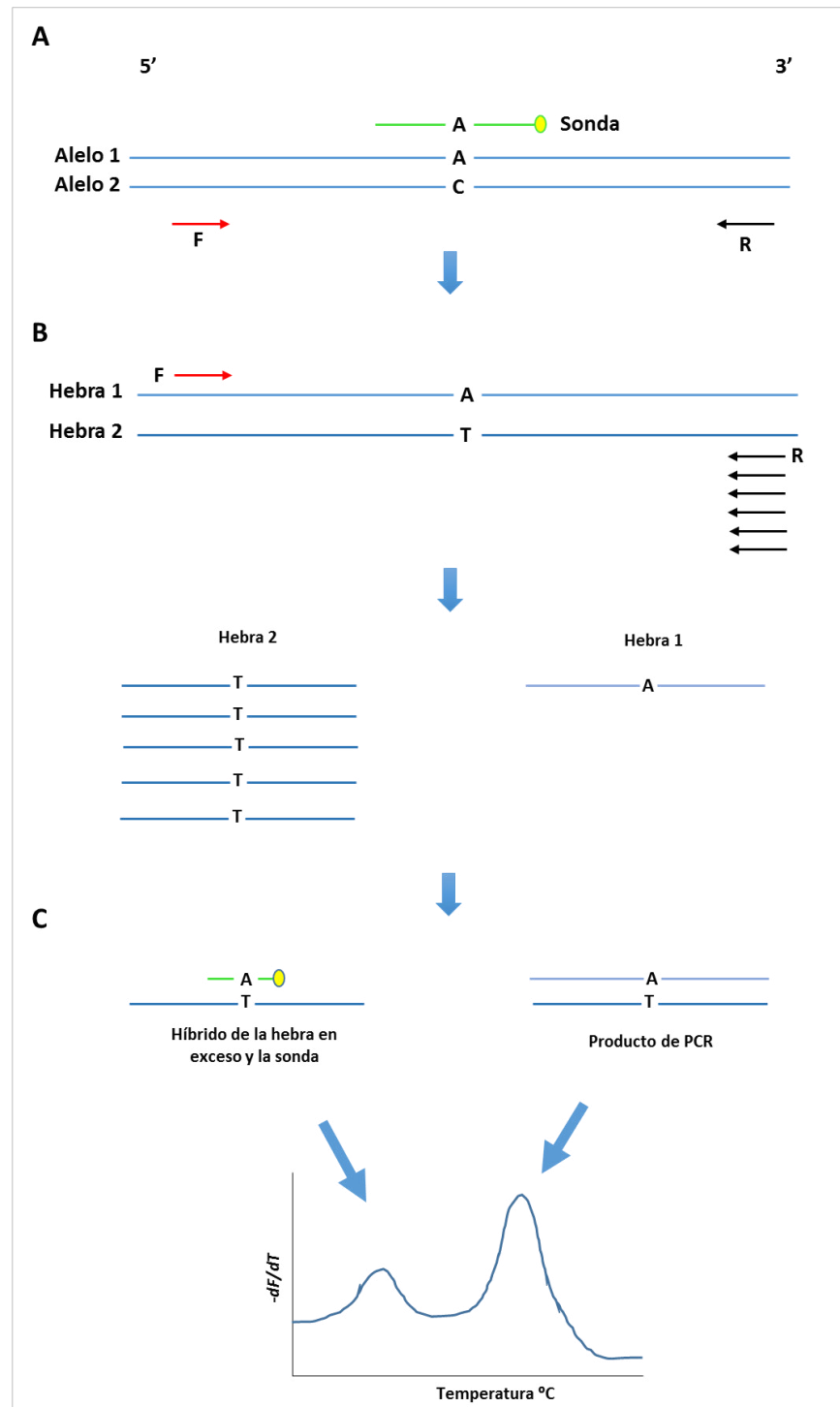


Figura 2. Procedimiento HRM. A) Diseño de sonda no marcada e iniciadores. B) PCR asimétrico. C) Formación del híbrido entre la sonda y la hebra en exceso del producto de PCR. La temperatura en la cual la doble hebra se separa de la sonda es representada en el gráfico por un pico a determinada temperatura. El producto de PCR tiene una temperatura de disociación mayor debido al tamaño de la doble hebra disociada.

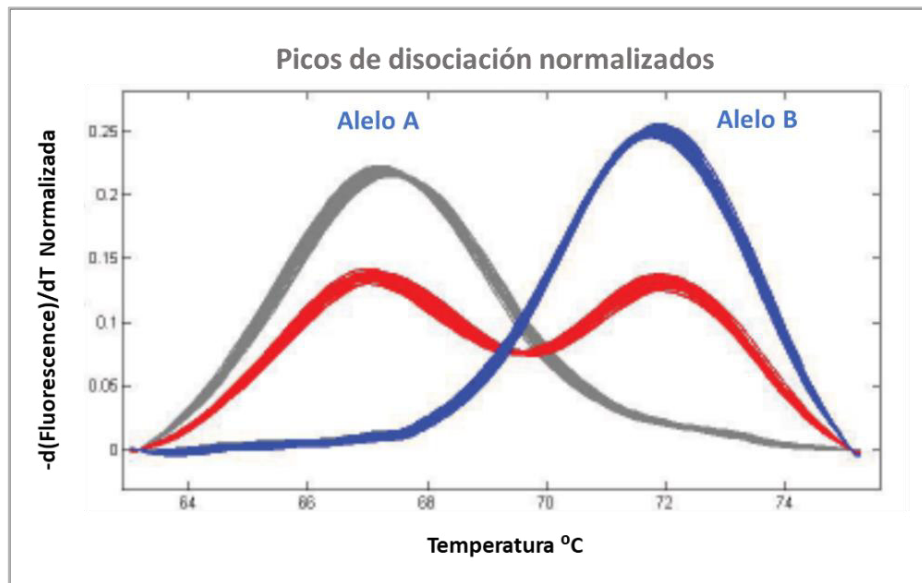


Figura 3. Dosaje alélico. En este ejemplo se analizan dos alelos para un mismo gen o locus. Los colores plomo, rojo y azul representan diferentes genotipos. Si analizamos el alelo B, la línea color plomo no forma un pico para este alelo, por lo cual su dosaje alélico será cero (nuliplex) para ese genotipo. En cambio, las líneas roja y azul si forman picos, la altura de estos picos estará en función del número de hebras de ADN unidos a la sonda. Entonces podremos decir que el genotipo en rojo posee una copia (simplex) del alelo B y el genotipo en azul posee dos copias (dúplex) del alelo B.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El ensayo HRM permite detectar el número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}* de *Solanum tuberosum* grupo Andigenum.

Objetivo general

Determinar la eficacia del ensayo HRM para la detección del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}* de *Solanum tuberosum* grupo Andigenum.

Objetivos específicos

- Desarrollar poblaciones derivadas de parentales con distinto número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}* (cv. Costanera, TXY.2 y LBr-43).
- Aplicar el ensayo molecular HRM para la detección del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}* en cada población.
- Utilizar la prueba de bondad de ajuste del chi-cuadrado para comprobar que la segregación esperada de genotipos para el locus *Ry_{adg}* corresponda a la segregación teórica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de poblaciones derivadas de parentales con distinto número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.

Se realizaron tres cruces entre genotipos con distinto número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*:

a) Cruce CT: Se utilizó la variedad Costanera (simplex para el alelo resistente y cuyo dosaje alélico fue determinado mediante cruces de prueba) como el progenitor femenino y el clon TXY.2 como el progenitor masculino, este clon fue previamente identificado como triplex y luego fue designado como dúplex en los ensayos de HRM realizadas por Herrera *et al.*, (2018).

b) Cruce TL: Se realizó un cruce entre los genotipos TXY.2 (progenitor femenino) y LBr-43 (progenitor masculino y nuliplex para el alelo resistente).

c) Cruce LT: Se realizó un cruce entre los genotipos TXY.2 (progenitor masculino) y LBr-43 (progenitor femenino y nuliplex para el alelo resistente). Este cruce se realizó en caso TXY.2, al usarse como progenitor femenino, no sea compatible con LBr-43.

El material biológico se obtuvo del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP). Se sembraron tubérculos de los progenitores en macetas con tierra preparada. Para cada cruce, se colectaron las flores del progenitor masculino cuando estas estuvieron abiertas y fueron secadas a temperatura ambiente o bajo luz artificial durante 1 día o cinco horas, respectivamente. La colecta del polen se realizó con la ayuda de un cepillo eléctrico y el polen fue guardado a 4 °C en cápsulas de gelatina hasta el momento de su uso. Con ayuda de unas pinzas se emasculó al progenitor femenino al momento de empezar la floración, antes de que las flores estuvieran abiertas.

El cruce se realizó empapando el estigma del progenitor femenino con el polen del progenitor masculino. Se marcaron las flores fertilizadas para hacer un seguimiento

de la formación del fruto. Se procedió a la colecta de bayas cuando se observó que estaban bien formadas y se guardaron en bolsas de papel hasta que estuvieron maduras. Las bayas fueron maceradas en agua y se destrozaron manualmente para obtener las semillas. Las semillas se secaron sobre papel y se guardaron en sobres de papel hasta el momento de su uso. Para promover la germinación, las semillas fueron tratadas con Ácido Giberélico y se sembraron en bandejas con tierra preparada.

4.2. Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN se colectaron entre 0.2 a 0.22 g de hojas (Protocolo ABL-CIP, anexo 1). Se evaluó la calidad y cantidad del DNA en geles de agarosa y utilizando el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se preparó una dilución a 100 ng/μL que se guardó como respaldo a -20 °C y otra dilución a 20 ng/μL que fue utilizada en las reacciones de PCR.

4.3. Ensayo molecular HRM para la detección del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*

Se utilizó la combinación de sonda e iniciadores M6P2F1R1 diseñados por Herrera *et al.*, (2018) en base a las secuencias del marcador molecular M6: P2F1 (TAGATACGCCACTCCACATA), P2R1 (GAACCCATCCGTGATAAAT) y P2 (GCTGCTCGGGGTCACCAC). Esta combinación de iniciadores amplifica tanto el alelo resistente como los alelos susceptibles del locus M6; y la sonda P2 se une totalmente al alelo resistente y parcialmente a los demás alelos (Figura 4). El alelo resistente (M6R) posee en los sitios polimórficos dos guaninas (G G), los alelos susceptibles 1, 2 y 3 (M6S1, M6S2 y M6S3) poseen una adenina y una guanina (A G) y el alelo susceptible 4 (M6S4) contienen dos adeninas (A A). De acuerdo a su afinidad a la sonda podemos decir que el orden en el cual la sonda se disocia de los alelos conforme al aumento de la temperatura es: M6S4 (A A), M6S1, 2, 3 (A G) y M6R (G G).

Para ambas poblaciones, CT y TL, se amplificaron los controles cv. Costanera (simplex), TXY.2 (dúplex), LBr-43 (nultiplex) y negativo (agua libre de nucleasas). Para realizar el ensayo HRM se preparó la solución maestra del PCR asimétrico (tabla 2).

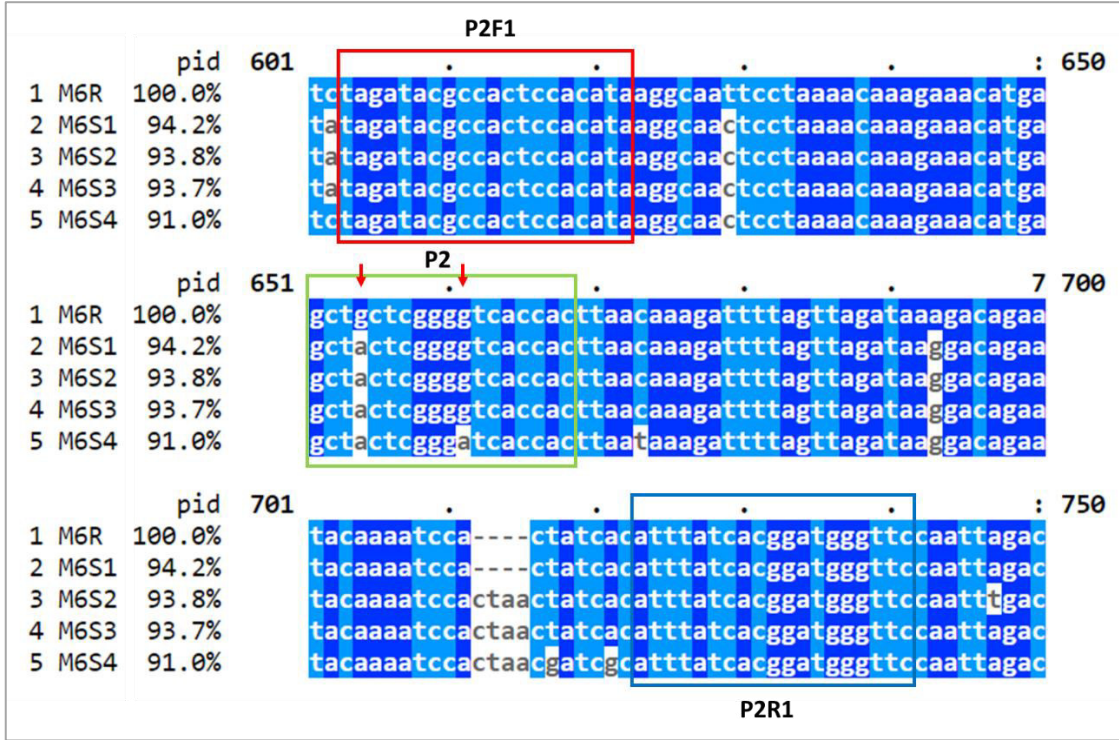


Figura 4. Alineamiento de las secuencias de los alelos del marcador molecular M6. Se indica la posición de los iniciadores P2F1 y P2R1 y de la sonda P2. Las flechas señalan la posición de los sitios polimórficos dentro de la secuencia de unión a la sonda. El producto de PCR tiene un tamaño de 135 ó 139 pb, dependiendo del alelo amplificado.

En la placa para PCR (WHT/WHT Hard-Shell, BioRad) se colocó la solución maestra y el ADN al fondo de cada pocillo. El ADN se mezcló con la solución maestra mediante pipeteo, se realizó el mismo número de pipeteos a cada pocillo de la placa. Se agregaron 15 µL de aceite mineral a cada pocillo y se cubrió la placa con el *film* Microseal B (cat. # MSB1001, Bio-Rad).

Se siguió el protocolo de PCR indicado en la tabla 3. Se adicionó un paso de denaturación final para permitir la formación del híbrido entre la hebra en exceso y la sonda.

Tabla 2. Preparación de la solución maestra para el PCR asimétrico.

	Concentración inicial	Concentración final	1 Reacción
Agua libre de nucleasas	–	–	3.58 µL
Buffer 10X	10 X	1X	1 µL
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	0.5 µL
dNTPs	5 mM	0.2 mM	0.4 µL
Iniciador Forward P2F1	10 µM	0.02 µM	0.02 µL
Iniciador Reverse P2R1	10 µM	0.2 µM	0.2 µL
Sonda P2	10 µM	0.2 µM	0.2 µL
LC Green	–	–	1 µL
<i>Taq</i> ADN Polimerasa (INVITROGEN, cat. # 18038-042)	5 U/µl	0.5 U	0.1 µL
DNA	20 ng/ µl	–	3 µL
Volumen total			10 µl

Tabla 3. Condiciones de amplificación para el PCR asimétrico.

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	94 °C	2 min	1 ciclo
Denaturación	94 °C	40 seg	55 ciclos
Hibridación	60.5 °C	40 seg	
Extensión	72 °C	45 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo
Denaturación adicional	94 °C	30 seg	1 ciclo
Temperatura final	25 °C	∞	1 ciclo

La amplificación se llevó a cabo en un equipo MJ Research PTC-100. Se centrifugó la placa en un Mini plate spinner (Labnet MPS 1000) y con cuidado se colocó un nuevo *film* (Optical Tape cat. # 2239444, Bio-Rad), sin dejar manchas sobre la superficie.

Se procedió a hacer la lectura en el equipo HRM. Se colocó la placa en el equipo LightScanner (Idaho Technology Inc.) y se procedió a hacer la corrida siguiendo los siguientes parámetros: temperatura de inicio 45 °C, temperatura final 95 °C, dejando la exposición en automático. Conforme la temperatura aumenta las hebras de ADN se separan, el fluoróforo se libera y se detecta la pérdida de fluorescencia de las distintas dobles hebras de ADN presentes en la muestra. Como resultado el equipo presenta un gráfico de datos crudos donde aparecen curvas que muestran la disminución de fluorescencia en cada muestra conforme aumenta la temperatura (figura 5).

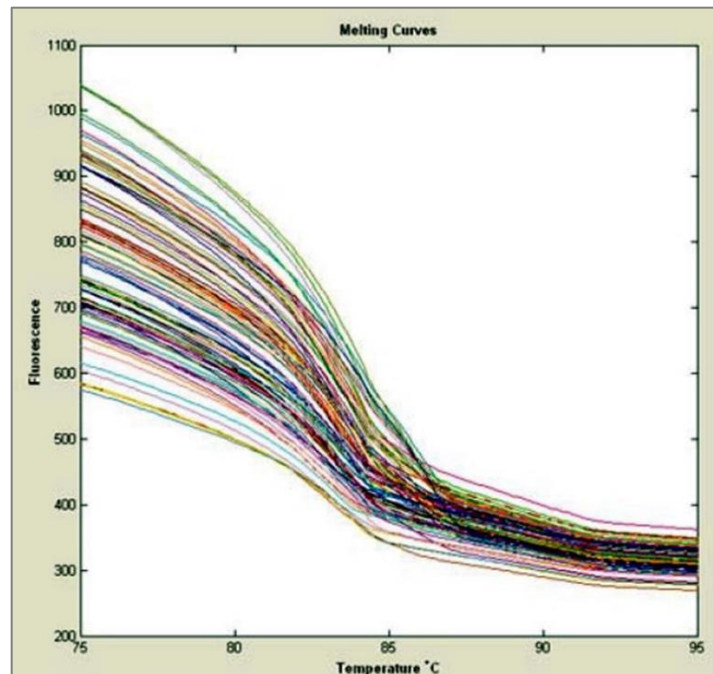


Figura 5. Gráfico de los datos crudos obtenidos en el equipo de HRM. Se observa la disminución de la fluorescencia para cada muestra conforme la temperatura aumenta. Gráfico obtenido del Manual del operador- LightScanner versión 2.0.

Posteriormente, los datos fueron analizados en el módulo análisis de sondas no marcadas del LightScanner Instrument & Analysis Software versión 2.0.0.1331.

Para el análisis se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Filtro de negativos: Se eliminaron las muestras control negativas (agua libre de nucleasas), aquellas en las que la reacción de PCR no produjo el amplicón esperado y pocillos vacíos (figura 6 A y B).
- 2) Normalización: Se normalizaron las curvas de disociación estableciendo las temperaturas mínimas y máximas donde se disocia la sonda, 60.8 - 75.8 °C (Herrera *et al.*, 2018) (figura 6 C). En la figura 6 D y E se observan los gráficos obtenidos como resultado del proceso de normalización, para una buena normalización se debe observar que en el gráfico de curvas de disociación normalizadas (figura 6 D) se formen unas regiones planas antes y después de las curvas.
- 3) Agrupamiento: Se procedió a agrupar las muestras de acuerdo a su perfil de disociación, usando la opción Autogrupo y un nivel de sensibilidad normal ajustado a +0.9 (figura 6 D y E).
- 4) Cálculo de la Temperatura de disociación, T_m : Finalmente, el software calcula automáticamente la T_m para cada muestra (figura 6 F). La T_m se define como el punto en la curva en la cual se encuentran disociados el 50% del híbrido del producto de PCR con la sonda.

Los detalles técnicos sobre el análisis se encuentran en el Manual del operador-LightScanner versión 2.0.

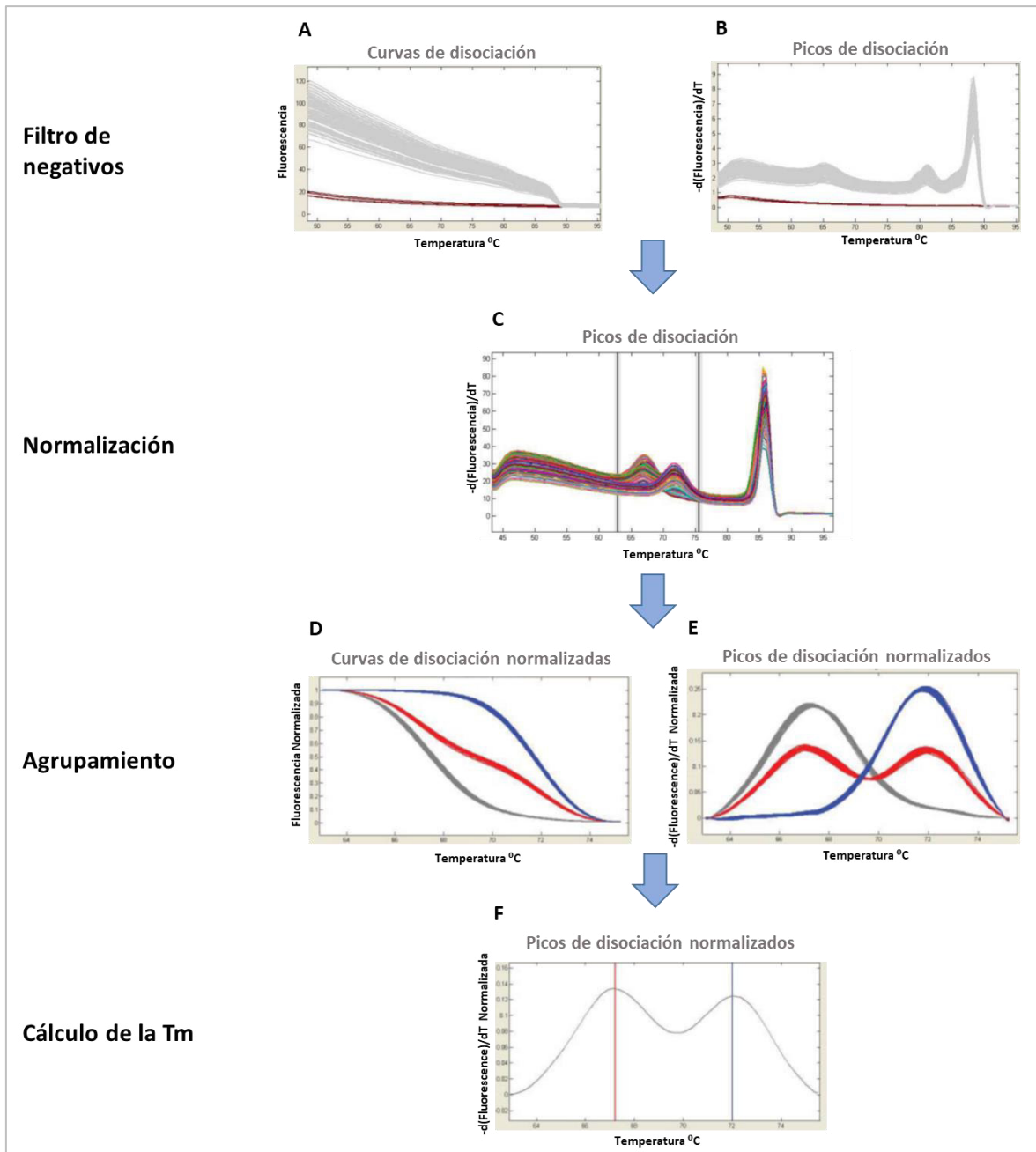


Figura 6. Flujo del análisis de datos en LightScanner Instrument & Analysis Software versión 2.0.0.1331. En marrón se observan las muestras eliminadas por el filtro de negativos (A y B). En la figura C las líneas verticales indican el rango de temperaturas para el análisis del híbrido del producto de PCR con la sonda P2. En la figura D y E, los grupos son representados mediante diferentes colores. En la figura F las líneas verticales indican la temperatura de disociación, T_m , para cada pico. Gráficos adaptados del Manual del operador- LightScanner versión 2.0.

4.3. Prueba de bondad de ajuste del chi-cuadrado

La prueba de bondad de ajuste de chi-cuadrado se utilizó para determinar si la distribución alélica observada con el ensayo HRM corresponde a la segregación teórica esperada. Para la población CT (cruce entre un simplex y un dúplex) la segregación teórica del locus Ry_{adg} es 1N:5S:5D:1T (un nuliplex : cinco simplex : cinco duplex : un triplex) (figura 7). En el caso de la población TL (cruce entre un dúplex y un nuliplex) la segregación teórica del locus Ry_{adg} es 1N:4S:1D (un nuliplex : cuatro simplex : un dúplex) (figura 8).

Para aceptar o rechazar esta hipótesis se comparó el valor p (p-value, en inglés) con el nivel de significancia (α) de 0.05. Bremer y Doerge, (2010), indican que si el valor p es menor que el nivel de significancia, la hipótesis se rechaza; y si el valor p es mayor o igual al nivel de significancia, se falla en rechazar la hipótesis.

<div style="text-align: center;"> $Rrrr$ x $RRrr$ ♀ ♂ </div>			
Gametos paternos	1/6 RR	4/6 Rr	1/6 rr
Gametos maternos			
3/6 Rr	3/36 RRRr	12/36 RRrr	3/36 Rrrr
3/6 rr	3/36 RRrr	12/36 Rrrr	3/36 rrrr

Genotipo

RRRR = 0/12

RRRr = 1/12

RRrr = 5/12

Rrrr = 5/12

rrrr = 1/12

Figura 7. Segregación esperada para el cruce F1 de cv. Costanera (Rrrr) x TXY.2 (RRrr)

<div> <div>RRrr</div> <div>♀</div> </div> <div> <div>x</div> <div>rrrr</div> <div>♂</div> </div>		
<div> <div>Gametos paternos</div> <div>Gametos maternos</div> </div>	6/6 rr	
1/6 RR	6/36 RRrr	Genotipo RRRR = 0/6 RRRr = 0/6 RRrr = 1/6 Rrrr = 4/6 rrrr = 1/6
4/6 Rr	24/36 Rrrr	
1/6 rr	6/36 rrrr	

Figura 8. Segregación esperada para el cruce F1 de TXY.2 (RRrr) x LBr-43 (rrrr)

4.4. Ensayo de resistencia a PVY

Se realizó la inoculación mecánica de la cepa PVY° en tres repeticiones para cada genotipo evaluado. Como controles se utilizaron los genotipos cv. Costanera (resistente), TXY.2 (resistente) y LBr-43 (susceptible). Para la inoculación mecánica se espolvoreó dos o tres folíolos, de la parte media o superior de la planta, con polvo abrasivo Carborundum y se aplicó el inóculo cuidadosamente para no dañar las hojas. Para el inóculo se utilizó un macerado de hojas de *Nicotiana occidentalis*, conteniendo la cepa PVY°. Treinta días después de la inoculación, se observaron las plantas en búsqueda de síntomas y se colectaron hojas para la prueba DAS-ELISA, la cual detecta el virus por medio de la unión antígeno: anticuerpo. La prueba DAS-ELISA fue realizada por la Unidad de Virología del CIP, utilizando un anticuerpo específico para la cepa PVY°, de acuerdo al protocolo de Salazar y Jayasinghe, 1997 (Anexo 2).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención de poblaciones derivadas de parentales con distinto número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.

De Koeyer *et al.*, (2010) comprobaron que el ensayo HRM con sonda no marcada puede ser utilizado para medir el dosaje alélico en especies diploides y tetraploides, como es el caso de la papa. Con la intención de obtener un método más rápido que los métodos convencionales de detección del número de alelos resistentes del gen *Ry_{adg}* en tetraploides Herrera *et al.*, (2018) diseñaron el ensayo HRM de sonda no marcada para el marcador molecular M6.

En el presente estudio se buscó determinar la eficacia este ensayo HRM, para lo cual se realizaron tres cruces utilizando los parentales cv. Costanera, TXY.2 y LBr-43; a partir de los cuales se obtuvieron dos poblaciones:

- a) Población CT: Conformada por 220 genotipos a partir del cruce de cv. Costanera x TXY.2.
- b) Población TL: Conformada por 163 genotipos a partir de la cruce de prueba de TXY.2 con LBr-43.

La obtención exitosa de la población CT demuestra que cv. Costanera es compatible con TXY.2 para la reproducción. Además, se obtuvo con éxito la población TL. Sin embargo, no se obtuvo progenie a partir del cruce entre LBr-43 (femenino) y TXY. 2 (masculino). Por lo cual, es importante recalcar que TXY.2 no pudo ser utilizado tanto como parental femenino y parental masculino en el cruce con LBr-43, debido a que un genotipo no siempre es un buen parental femenino y masculino, sino que solo puede actuar como uno de ellos, de acuerdo a las barreras de incompatibilidad que puedan existir entre los genotipos usados en un cruce. Esto coincide con lo descrito por Maune *et al.*, (2017) y de Nettancourt (2001): existen barreras de incompatibilidad pre-cigótica relacionada al cruce entre dos especies fértiles, las cuales ocasionan la no formación del cigoto híbrido como consecuencia de la interacción entre el polen y el pistilo. Este tipo de incompatibilidad puede ser

unilateral o bilateral, dependiendo si un genotipo es usado como parental masculino y/o femenino.

5.2. Extracción de ADN

Se extrajo ADN de un total de 386 genotipos. Tres muestras correspondientes a los genotipos parentales cv. Costanera, TXY.2 y LBr-43; 220 a la población CT y 163 a la población TL. Se verificó la calidad y cantidad de ADN en geles de agarosa y en el equipo Nanodrop. Se obtuvo una cantidad promedio de ADN de 2500 ng/μL, a partir de la cual se prepararon las diluciones de 100 y 20 ng/μL.

5.3. Ensayo molecular HRM para la detección del número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.

Después del PCR asimétrico y la lectura en el equipo HRM, las muestras fueron analizadas con el LightScanner Instrument & Analysis Software versión 2.0.0.1331. En la figura 9, se muestra una vista simplificada de los perfiles obtenidos en el ensayo HRM para los genotipos parentales, en la cual uno de los picos representa a los alelos M6S1, 2, 3 con un T_m de 66.5 °C y el otro pico representa al alelo M6R con un T_m de 72 °C. Además, se observa que TXY.2 posee los alelos M6R y M6S1, 2, 3; al igual que cv. Costanera. Estos alelos corresponden a las bandas de 800 y 300 (M6R) y 1100 pb (M6S1, 2, 3), del marcador M6 *RsaI* en cv. Costanera. Los alelos susceptibles 1, 2 y 3 son representados por un mismo pico debido a que la sonda analiza solo una parte de la secuencia de M6. El control LBr-43 muestra el perfil esperado de un solo pico correspondiente al alelo M6S1, 2, 3.

a) Población CT

De los 220 genotipos de la población CT, 217 mostraron curvas de disociación correspondientes a los dos picos (M6R y M6S1, 2, 3). Las demás muestras producían curvas poco definidas; esto pudo deberse a una mala calidad de estas muestras de ADN.

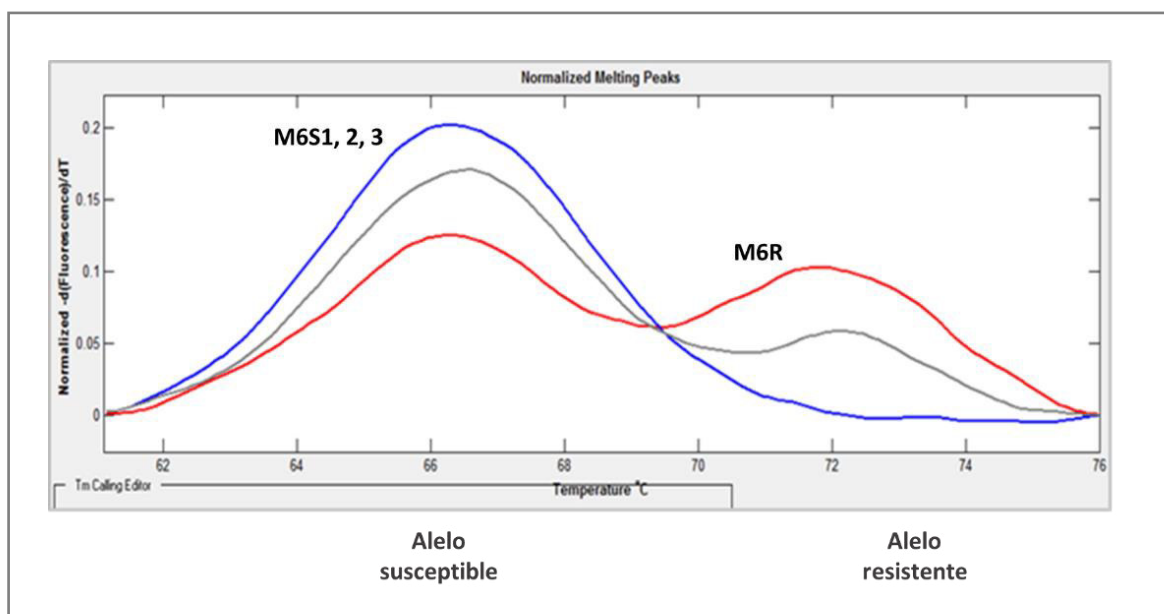


Figura 9. Picos de disociación de los genotipos parentales. Para el pico correspondiente al alelo resistente M6R, LBr-43 es nuliplex (azul), cv. Costanera es simplex (gris) y TXY.2 es dúplex (rojo). Para el pico correspondiente a los alelos susceptibles M6S1,2,3, LBr-43 es cuadruplex (azul), cv. Costanera es triplex (gris) y TXY.2 es dúplex (rojo).

En la figura 10 se muestra el análisis de las muestras de una parte de la población CT. Se realizó el filtró de negativos, excluyéndose del análisis las muestras que no amplificaron, se normalizaron las muestras de acuerdo a las temperaturas en las que se disocia la sonda del ADN (60.8 - 75.8 °C), se agruparon según los perfiles que presentaba cada muestra y finalmente se calculó la Tm de cada pico de disociación.

Las curvas de disociación observadas para los genotipos parentales indican que cv. Costanera es simplex y TXY.2 es dúplex para el alelo resistente. La progenie del cruce cv. Costanera x TXY.2 se agrupa en cuatro grupos: nuliplex para el alelo resistente (agrupándose con el control susceptible, clon LBr-43), simplex para el alelo resistente (que se agrupa con cv. Costanera), dúplex para el alelo resistente (que se agrupa con TXY.2) y triplex para el alelo resistente. En la figura 11 se muestra el resultado del ensayo HRM para un grupo de genotipos de la población.

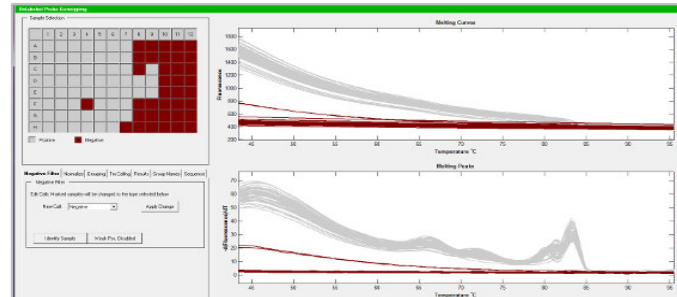
b) Población TL

En la población TL también se observaron los dos picos de disociación, correspondientes a los alelos M6R y M6S1, 2, 3 (Figura 12). Las curvas de disociación reiteraron los resultados obtenidos para la población CT. Los genotipos parentales y control: TXY.2 dúplex, LBr-43 nuliplex y cv. Costanera simplex para el alelo M6R. Los individuos de la progenie TL se agruparon en genotipos nuliplex, simplex y dúplex para el alelo M6R.

Los resultados obtenidos en las poblaciones CT y TL concuerdan con lo reportado por Herrera *et al.*, (2018), donde obtuvieron los perfiles de cv. Costanera, TXY.2 y LBr-43 al realizar un ensayo HRM que incluía un panel de diferentes genotipos susceptibles y resistentes con variadas fuentes de origen de resistencia y número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}* determinado mediante cruza de prueba. Además, se pudieron distinguir tanto los picos correspondientes a los diferentes alelos (M6R y M6S1,2,3) como el número de copias de cada alelo (nuliplex, simplex, duplex, triplex) sin dificultad, lo cual facilitaría el uso de este ensayo. Herrera *et al.*, (2018) pudo distinguir también el alelo M6S4, demostrando que es factible la detección de más alelos en un solo ensayo.

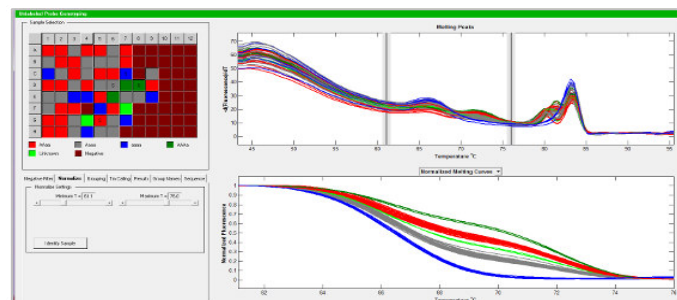
Filtro de negativos

A



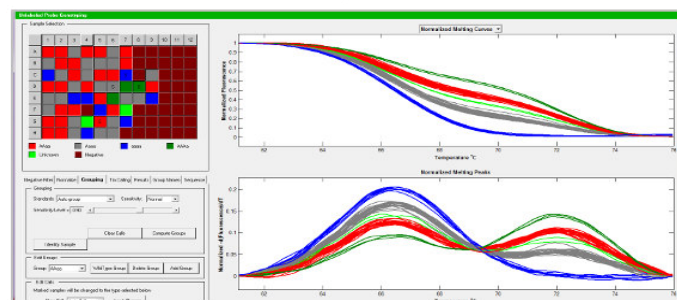
Normalización

B



Agrupamiento

C



Cálculo de la Tm

D

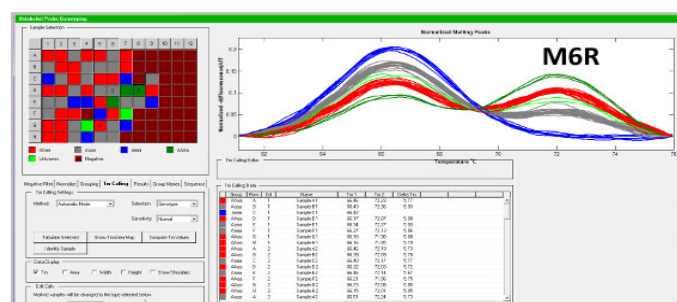


Figura 10. Análisis HRM en una parte de la población cv. Costanera x TXY.2. (A) Se observan en marrón las muestras que fueron retiradas del análisis. Después de la normalización (B) y el agrupamiento (C) se observan 4 grupos: genotipos nuplex (azul), simplex (gris), dúplex (rojo) y triplex (verde) para el alelo M6R. El cálculo de la Tm (D) indica que la TM para el alelo M6S1,2,3 es 66.5 °C y para el alelo M6R es 72 °C.

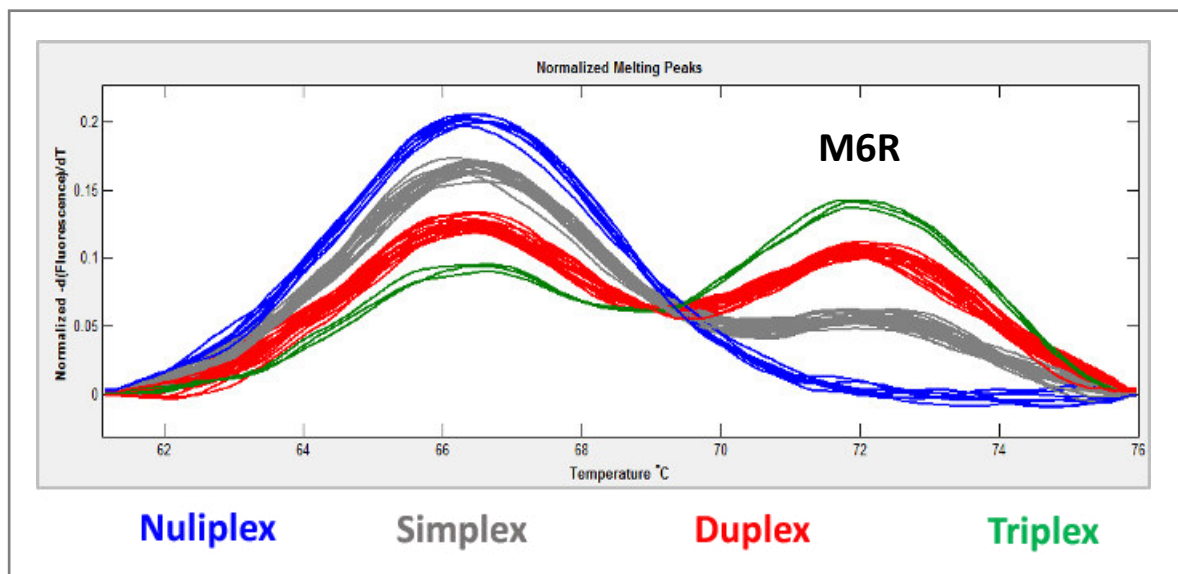


Figura 11. Perfiles de los diferentes dosajes alélicos del alelo resistente (M6R) encontrados en la población cv. Costanera x TXY.2.

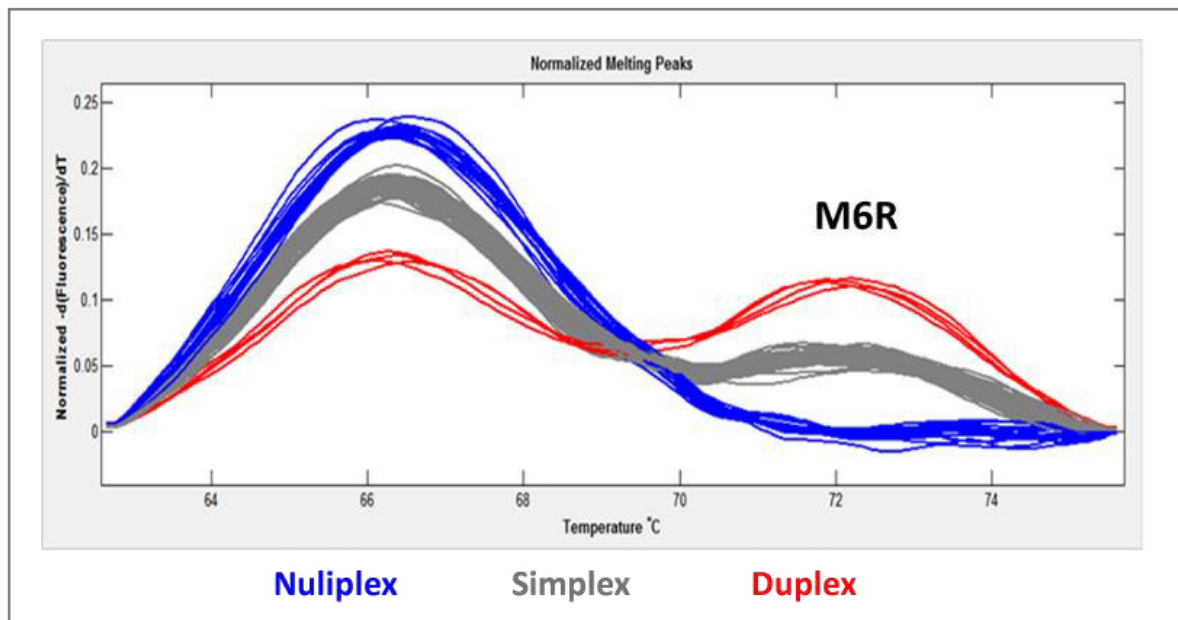


Figura 12. Perfiles de los diferentes dosajes alélicos del alelo resistente (M6R) encontrados en la población TXY.2 x LBr-43.

5.4. Prueba de bondad de ajuste del chi-cuadrado

a) Población CT

Se contabilizó el número de genotipos de la población CT que pertenecen a cada grupo. Dos son triplex, 84 son dúplex, 101 son simplex y 30 son nuliplex. La presencia de genotipos nuliplex, la cual se espera en un cruce entre un genotipo simplex y dúplex y no en el cruce de un simplex con un triplex, confirmó a TXY.2 como un progenitor dúplex. Sin embargo, la segregación observada es diferente de la segregación teórica esperada (1N:5S:5D:1T). La prueba de bondad de ajuste de chi-cuadrado ($\chi^2 = 23.854$; $p < 0.001$; $p \leq 0.05$) rechaza la hipótesis de que los valores observados corresponden al cruce entre un genotipo simplex y un dúplex (Anexo 3).

De acuerdo al pedigrí de TXY.2 proporcionado por Mihovilovich (Comunicación personal) (Figura 13) este posee como ancestro al cv. Costanera por lo que puede existir un efecto adverso sobre el desarrollo de la planta, causado por la endogamia, relacionado a la acumulación al número de copias del alelo resistente y/o a toda la cromátide heredada. Por lo cual, para explicar los resultados observados se formularon dos hipótesis: Hipótesis 1, la segregación 1N:5S:5D:1T se ve afectada porque aquellos genotipos triplex para el alelo resistente no pueden germinar o sobrevivir, en cuyo caso la segregación sería 1N:5S:5D (Figura 14). Hipótesis 2, la segregación 1N:5S:5D:1T se ve afectada porque los gametos con dos alelos de resistencia no son viables, en cuyo caso la segregación sería 1N:5S:4D (Figura 15).

Para la hipótesis 1 se obtuvo un chi-cuadrado de 7.551, con un $p=0.023$. El valor p de 0.023 es menor que el nivel de significancia 0.05, por lo cual los datos rechazan la hipótesis 1 (Anexo 4). Para la hipótesis 2 se obtuvo un chi-cuadrado de 3.8, con un $p=0.15$. El valor p de 0.15 es mayor que el nivel de significancia 0.05, por lo cual los datos no permiten rechazar la hipótesis 2 (Anexo 5). Los resultados de las pruebas chi-cuadrado indican que la hipótesis 2 podría explicar las desviaciones de la segregación observadas en la población CT. Sin embargo, la identificación de dos genotipos triplex sugiere que existiría una viabilidad limitada de los gametos con dos copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}* en lugar de una pérdida completa

de la viabilidad. Estos resultados comprobarían que el cruce de cv. Costanera x TXY.2 es un cruce entre un simplex y un dúplex y que el ensayo HRM puede detectar correctamente el número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.

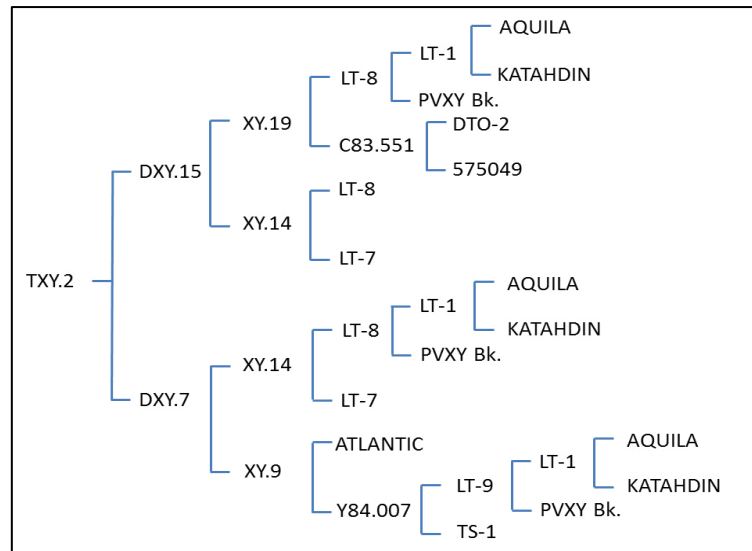


Figura 13. Pedigrí del clon TXY.2. Observar que cv. Costanera (LT-8) forma parte del grupo de progenitores de TXY.2 (Mihovilovich, comunicación personal).

$Rrrr \times RRrr$ ♀ ♂				Genotipo RRRR = 0/11 RRRr = 0/11 RRrr = 5/11 Rrrr = 5/11 rrrr = 1/11
Gametos paternos \ Gametos maternos	1/6 RR	4/6 Rr	1/6 rr	
3/6 Rr	3/36 RRRr	12/36 RRrr	3/36 Rrrr	
3/6 rr	3/36 RRrr	12/36 Rrrr	3/36 rrrr	

Figura 14. La segregación esperada para el cruce F1 de cv. Costanera (Rrrr) x TXY.2 (RRrr) según la hipótesis 1 es 1N:5S:5D. En rojo se señalan los genotipos no viables. Las proporciones esperadas de un cruce de Rrrr x RRrr (1N:5S:5D:1T) varían, ya que de 36 genotipos producidos en un cruce, 3 no podrán ser observados dentro de la progenie, debido a no podrían germinar o sobrevivir.

$\begin{array}{c} Rrrr \quad \times \quad RRrr \\ \text{♀} \quad \quad \quad \text{♂} \end{array}$																			
<table border="1"> <tr> <td>Gametos paternos</td><td>1/6 RR</td><td>4/6 Rr</td><td>1/6 rr</td></tr> <tr> <td>Gametos maternos</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>3/6 Rr</td><td>3/36 RRRr</td><td>12/36 RRrr</td><td>3/36 Rrrr</td></tr> <tr> <td>3/6 rr</td><td>3/36 RRrr</td><td>12/36 Rrrr</td><td>3/36 rrrr</td></tr> </table>	Gametos paternos	1/6 RR	4/6 Rr	1/6 rr	Gametos maternos				3/6 Rr	3/36 RRRr	12/36 RRrr	3/36 Rrrr	3/6 rr	3/36 RRrr	12/36 Rrrr	3/36 rrrr			
Gametos paternos	1/6 RR	4/6 Rr	1/6 rr																
Gametos maternos																			
3/6 Rr	3/36 RRRr	12/36 RRrr	3/36 Rrrr																
3/6 rr	3/36 RRrr	12/36 Rrrr	3/36 rrrr																

Genotipo

RRRR = 0/10

RRRr = 0/10

RRrr = 4/10

Rrrr = 5/10

rrrr = 1/10

Figura 15. La segregación esperada para el cruce F1 de cv. Costanera (Rrrr) x TXY.2 (RRrr) según la hipótesis 2 es 1N:5S:4D. En rojo se señalan el gameto y genotipos no viables. Las proporciones esperadas de un cruce de Rrrr x RRrr (1N:5S:5D:1T) varían, ya que de 36 genotipos producidos en un cruce, 6 no podrán ser observados dentro de la progenie, debido a que los gametos RR no serían viables.

Para corroborar los resultados obtenidos con el ensayo HRM se realizó una evaluación fenotípica mediante inoculación mecánica de PVY^o en 34 genotipos de la población CT, incluyendo genotipos nuliplex, simplex, dúplex y triplex. Se incluyó a LBr-43 como control. Se observaron síntomas y se obtuvieron resultados positivos para DAS-ELISA sólo en LBr-43 y no en los genotipos nuliplex. Estos resultados podrían ser explicados por una falla en el proceso de infección o por la presencia de otro gen de resistencia a PVY en el genotipo TXY.2. Por lo cual, se realizó un cruce de prueba para el genotipo TXY.2 y se obtuvo la población TL. El ensayo HRM y la prueba fenotípica se realizaron en esta población para evaluar la presencia de otro gen de resistencia en TXY.2.

b) Población TL

De los 163 genotipos de la población TL, dos no amplificaron, 25 son nuliplex y 136 son simplex. La prueba de bondad de ajuste de chi-cuadrado cuadrado ($\chi^2 = 34.607$; $p < 0.001$; $p \leq 0.05$) rechaza la hipótesis de que los valores observados correspondan al cruce entre un genotipo dúplex y un nuliplex (1N:4S:1D) (Anexo 6). Ante este resultado, se analizaron los datos utilizando la hipótesis 2 (1N:4S) (figura 16). La prueba de bondad de ajuste chi-cuadrado ($\chi^2 = 2.012$; $p = 0.156$; $p \leq 0.05$) falla en rechazar la hipótesis 2 (Anexo 7). Se realizó la evaluación fenotípica de 10 genotipos nuliplex, 10 genotipos simplex y los controles TXY.2 y LBr-43. Sólo tres genotipos nuliplex y LBr-43 mostraron síntomas de infección y dieron positivo para DAS-ELISA. La ausencia de síntomas y resultados negativos de DAS-ELISA en 7 genotipos nuliplex, sugiere nuevamente la presencia de otro gen de resistencia en TXY.2.

		RRrr x rrrr	
		♀	♂
Gametos maternos	Gametos paternos	6/6 rr	
	1/6 RR	6/36 RRrr	Genotipo RRRR = 0/5 RRRr = 0/5 RRrr = 0/5 Rrrr = 4/5 rrrr = 1/5
	4/6 Rr	24/36 Rrrr	
	1/6 rr	6/36 rrrr	

Figura 16. La segregación esperada para el cruce F1 de TXY.2 (RRrr) x LBr-43 (rrrr) según la hipótesis 2 es 1N:4S. En rojo se señalan el gameto y genotipos no viables. Las proporciones esperadas de un cruce de RRrr x Rrrr (1N:4S:1D) varían, ya que de 36 genotipos producidos en un cruce, 6 no podrán ser observados dentro de la progenie, debido a que los gametos RR no serían viables.

Xu *et al*, (2017) indica la ventaja del ensayo HRM de sonda no marcada frente a un ensayo HRM que no utiliza esta sonda, en el cual se mide la disminución de la emisión de la fluorescencia del elemento intercalado entre las hebras de ADN del producto de PCR. Este ensayo puede verse afectado por el tamaño del producto de PCR y el tipo de mutación; además de que pequeñas diferencias en la T_m podrían no ser detectadas. En cambio, en un ensayo HRM de sonda no marcada, un solo nucleótido de diferencia dentro de la corta secuencia a la que se une la sonda, puede significar un gran cambio en la T_m (entre 3 a 5 °C). Por lo cual, este ensayo puede usarse para detectar diferencias entre los alelos de un mismo gen, amplificados por un mismo par de iniciadores. Este ensayo también puede usarse para detectar SNPs (Polimorfismo de un solo nucleótido; del inglés, Single nucleotide polymorphism) y realizar el genotipaje de mutaciones. Xu *et al*, (2017) logró detectar 3 mutaciones en diferentes posiciones del gen ATP7B, causantes de la enfermedad de Wilson, caracterizada por la acumulación de cobre en el hígado o el sistema nervioso, causando su mal funcionamiento.

El ensayo de HRM de sonda no marcada permite la rápida obtención de resultados en comparación a las pruebas rutinarias de generación de cruces y fenotipificación. Se pueden obtener muestras de ADN cuando las plantas aún están pequeñas y no han alcanzado su etapa reproductiva. Además, de que para pruebas de fenotipificación se necesita generar un número de tres repeticiones, para los ensayos de inoculación del virus, mediante propagación vegetativa, lo cual significa invertir meses y cantidad de recursos.

No se utilizan geles u otras matrices, y debido a que la sonda no es fluorescente se reducen los costos. En otros estudios se puede tomar en cuenta que una única sonda puede detectar múltiples alelos y se pueden utilizar múltiples sondas simultáneamente para diferentes regiones del producto de PCR (Montgomery *et al.*, 2007).

El uso del equipo de HRM LightScanner no limita el uso de esta prueba a laboratorios que cuentan con otros equipos que puedan analizar curvas de disociación. Wu *et al.*, (2011) diseñó un ensayo de sonda no marcada para la detección de mutaciones somáticas causantes de Policitemia Vera, la cual es un

trastorno de la médula ósea. Este ensayo pudo ser exitosamente reproducido en otros laboratorios y en otros equipos, incluso en aquellos que no eran de alta resolución. Entre los diferentes equipos aparecían algunas variaciones respecto a las temperaturas de los picos de disociación, pero los resultados finales fueron similares. Por lo que el presente ensayo de detección de dosaje alélico también podría ser usado en otros laboratorios que no cuenten con un equipo de alta resolución.

Finalmente, el ensayo HRM de sonda no marcada demostró su eficacia al distinguir genotipos resistentes de susceptibles y al identificar genotipos nuliplex, simplex, dúplex y triplex para el alelo resistente del gen *Ry_{adg}* de una forma rápida, sin tener que recurrir a ensayos fenotípicos en poblaciones segregantes. Además, Herrera *et al.*, (2018) demuestra que este ensayo puede detectar más de dos alelos, debido a que en el caso del clon UNICA, el ensayo pudo detectar los alelos M6R, M6S1, 2, 3 y M6S4. Esto es importante debido a la gran diversidad que existe en un cultivo como el de la papa u otras especies poliploides.

VI. CONCLUSIONES

1. Se pudo obtener las poblaciones CT y TL. Sin embargo, el cruce LT no produjo progenie, posiblemente debido a barreras de incompatibilidad.
2. Utilizando el ensayo de HRM de sonda no marcada se pudieron distinguir los picos de los alelos M6R y M6S1,2,3; además se pudo determinar el número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}* en las poblaciones CT y TL, agrupándose en genotipos nuliplex, simplex, duplex y triplex.
3. Mediante la prueba de bondad de ajuste del chi-cuadrado no se pudo rechazar la hipótesis 2, en la cual la segregación observada corresponde a la esperada cuando existe una viabilidad limitada de los gametos que contienen dos copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*. Además, se verificó que el genotipo TXY.2 es dúplex para el alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.
4. Se comprueba que el ensayo HRM de sonda no marcada es eficaz para determinar el número de copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*.

VII. RECOMENDACIONES

- Analizar genotipos de interés de programas de mejoramiento utilizando el ensayo HRM para facilitar la introgresión de *Ry_{adg}*.
- Investigar el mecanismo por el cual habría una viabilidad limitada de los gametos con dos copias del alelo resistente del gen *Ry_{adg}*: si existe un efecto por la producción de la proteína de resistencia (toxicidad, costo energético, etc.), o si la viabilidad limitada es causada por la acumulación del material genético que se encuentra alrededor de alelo de resistencia.
- Continuar con la investigación del genotipo TXY.2, para descartar o verificar la presencia de otro gen de resistencia a PVY.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barker, H. 1996. Inheritance of resistance to potato viruses Y and A in progeny obtained from potato cultivars containing gene *Ry*: evidence for a new gene for extreme resistance to PVA. *Theor Appl Genet* 93: 710-716

Bremer M.; Doerge R. W. 2010. *Statistics at the Bench: A Step-by-Step Handbook for Biologists*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Brigneti, G.; Garcia-Mas, J.; Baulcombe, D.C. 1997. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry^{sto}* in potato. *Theor Appl Genet* 94: 198-203

Brown, J.; Caligari, P.; Campos, H. 2014. *Genetics and Plant Breeding en Plant breeding* 2nd edition. Wiley-Blackwell

Celebi –Toprak, F.; Slack, S. A.; Jahn, M. M. 2002. A new gene, *Ny^{tbr}*, for hypersensitivity to Potato virus Y from *Solanum tuberosum* Maps to Chromosome IV. *Theor Appl Genet* 104: 669 – 674

Cockerham, G. 1970. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* 25 (3): 309-348

De Koeyer D.; Douglass K.; Murphy A.; Whitney S.; Nolan L.; Song Y.; De Jong W. 2010. Application of high-resolution DNA melting for genotyping and variant scanning of diploid and autotetraploid potato. *Mol Breeding* 25:67–90

De Nettancourt, D. 2001. *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants* 2nd edition. Springer-Verlag, Berlin.

De Storme, N.; Geelen, D. 2013. Sexual polyploidization in plants--cytological mechanisms and molecular regulation. *The New Phytologist*, 198(3), 670-84.

Flis, B.; Henning, J.; Strzelczyk-Zyta, D.; Gebhardt, C. 2005. The Ry-f_{sto} gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato Virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars. *Molecular Breeding* 15: 95-101

Gálvez, R.; Mendoza, H.A.; Fernandez-Northcote, E.N. 1992. Herencia a la inmunidad del virus Y de la papa (PVY) en clones derivados de *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. *Fitopatología* 27(1): 8-15

Ghislain, M.; Herrera Ma. Del R. 2004. Protocolos del Laboratorio de Biología Molecular. Tipificación Genética. División de Mejoramiento de Germoplasma y de Cultivos. Manual de capacitación. 3ra Edición. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP).

Hamalainen, J. H.; Watanabe, K. N.; Valkonen, J. P. T.; Arihara, A.; Plaisted, R.L.; Pehu, E.; Millar, L.; Snack, S.A. 1997. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor Appl Genet* 94: 192-197

Herrera, M.; Jara Vidalon, L.; Montenegro, J.; Riccio, C.; Guzman, F.; Bartolini, I.; Ghislain, M. 2018. Molecular and genetic characterization of the Ry_{adg} locus on chromosome XI from Andigena potatoes conferring extreme resistance to potato virus Y. *Theoretical and Applied Genetics*. 10.1007/s00122-018-3123-5.

Hooker, W. J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa. Perú

Hosaka, K.; Hosaka, Y.; Mori, M.; Maida, T.; Matsunaga, H. 2001. Detection of a Simplex RAPD Marker Linked to Resistance to Potato Virus Y in Tetraploid Potato. *Amer J of Potato Res* 78: 191-193

Jara Vidalón, L. 2010. Mapeo genético fino del locus *Ry_{adg}* en la progenie de *Solanum tuberosum* Costanera × LBr-43 (Tesis de grado). Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú

Kasai, K.; Morikawa, Y.; Sorri, V.A.; Valkonen, J. P. T.; Gebhardt, C.; Watanabe, K.N. 2000. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome* 43: 1-8

Le Romancer M.; Nedellec M. 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *Plant Pathology* 46: 104-111

Maune, J. F.; Camadro, E. L.; Erazzú, L. E. 2017. Cross-incompatibility and self-incompatibility: unrelated phenomena in wild and cultivated potatoes?. *Botany* 96 (1): 33-45

Mendoza, H. A.; Mihovilovich E.J.; Saguma F. 1996. Identification of Triplex (YYYy) Potato Virus Y (PVY) immune progenitors derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Am. Potato J.* 73:13-19.

Mihovilovich, E. 1996. Desarrollo e Identificación de Clones Parentales Inmunes a los Virus X e Y de la Papa: Un Éxito del Mejoramiento. CIP Circular

Mihovilovich, E.; Salazar, L. F.; Saguma, F.; Bonierbale, M. W. 1997. Survey of the Durability of Extreme Resistance to PVY Derived from *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. En: CIP Program Report 1997-98. Perú: 123-128

Mihovilovich. E.; Salazar, L.; Bonierbale, M. 2000. Durabilidad del gen de resistencia extrema al virus Y de la papa (PVY) de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (*Ry_{adg}*) presente en clones de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*. *Fitopatología* 35 (1):19-20

Montgomery, J.; Wittwer, C.T.; Palais, R.; Zhou, L. 2007. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. Nat Protoc. 2(1): 59-66.

Muñoz, F. J.; Plaisted, R. L.; Thurston, H. D. 1975. Resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. Am. Potato J. 52: 107-115

Orrillo, M.; Bonierbale M. 2009. Biología reproductiva y citogenética de la papa - Manual técnico. Centro Internacional de la Papa, Perú.

Salazar, L. F. 1996. Potato Viruses and Their Control. International Potato Center, Perú

Salazar, L. F.; Jayasinghe, U. 1997. Técnicas en Virología de Plantas. Manual de Capacitación. Centro Internacional de la Papa, Perú.

Singh, R. P.; Valkonen, J. P. T.; Gray, S. M.; Boonham, N.; Jones, R. A. C.; Kerlan, C.; Schubert, J. 2008. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. Arch Virol 153: 1-13

Solomon-Blackburn, R. M.; Barker, H. 2001a. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. Heredity 86:17-35

Solomon-Blackburn, R. M.; Barker, H. 2001b. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. Heredity 86: 8-16

Spooner, D. M.; Ghislain, M.; Simon, R.; Jansky, S. H.; Gavrilenko, T. 2014. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. Bot. Rev. 80:283–383

Szajko, K.; Chrzanowska, M.; Witek, K.; Strzelczyk-ôyta, D.; Zagórska, H.; Gebhardt, C.; Hennig, J.; Marczewski, W. 2008. The novel gene *Ny-1* on potato chromosome IX confers hypersensitive resistance to Potato virus Y and is an alternative to *Ry* genes in potato breeding for PVY resistance. *Theor Appl Genet* 116:297–303

Szajko, K.; Strzelczyk-Zyta, D.; Marczewski, W. 2014. *Ny-1* and *Ny-2* genes conferring hypersensitive response to potato virus Y (PVY) in cultivated potatoes: mapping and marker-assisted selection validation for PVY resistance in potato breeding. *Mol Breeding* 34:267–271

Thieme R.; Thieme T. 2005. Resistance to Viruses. En: Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volumen I: Potato. Razdan, M.K. & Mattoo A.K. (eds.) Science Publisher, Inc. New Hampshire.

Tomczynska, I.; Jupe. F.; Hein, I.; Marczewski, W.; Sliwka J. 2014. Hypersensitive response to Potato virus Y in potato cultivar Sárpo Mira is conferred by the *Ny-Smira* gene located on the long arm of chromosome IX. *Mol Breeding* 34:471–480

Valkonen, J. P. T.; Slack, S. A.; Plaisted, R. L.; Watanabe, K. N. 1994a. Extreme Resistance is Epistatic to Hypersensitive Resistance to Potato Virus Y° in a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*-Derived Potato Genotype. *Plant Disease* 78(12): 1177-1180

Valkonen, J.P.T. 1994b. Natural Genes and Mechanisms for Resistance to Viruses in Cultivated and Wild Potatoes Species (*Solanum* spp.). *Plant Breeding* 112: 1-16

Valkonen, J. P. T.; Rokka, V. M.; Watanabe K. N. 1998. Examination of the Leaf-Drop Symptom of Virus-Infected Potato Using Anther Culture-Derived Haploids *Phytopathology* 88(10): 1073-1077

van Eck, H.J.; Vos, P.G.; Valkonen, J.P.T.; Uitdewilligen Jan G. A. M. L.; Lensing H.; de Vetten N.; Visser Richard G. F. 2017. Graphical genotyping as a method to map *Ny_{(o,n)sto}* and *Gpa5* using a reference panel of tetraploid potato cultivars. Theor Appl Genet 130: 515.

Wu, Z.; Yuan, H.; Zhang, X.; Liu, W.; Xu, J.; Zhang, W.; Guan, M. 2011. Development and Inter-Laboratory Validation of Unlabeled Probe Melting Curve Analysis for Detection of JAK2 V617F Mutation in Polycythemia Vera. PLoS ONE 6(10)

Xu, A.; Lv, T.; Zhang, B.; Zhang, W.; Ou, X.; Huang, J. 2017. Development and evaluation of an unlabeled probe high-resolution melting assay for detection of ATP7B mutations in Wilson's disease. J Clin Lab Anal. Jul;31(4).

Zhou, L.; Myers, AN.; Vandersteen, JG.; Wang, L.; Wittwer, CT. 2004. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. Clin Chem.50(8):1328-35.

IX. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN Genómico (pequeña escala)

Ghislain *et al.* 2004

Homogenización del Tejido

- Cortar las hojas (0.20-0.22 gr. Aprox.) y colocarlas en microtubos esterilizados de 2 ml.
- Colocar las esferas de cerámica esterilizada dentro de los microtubos.
- Agregar 750 µl de buffer de extracción CTAB 2X y 2 µl de Mercaptoetanol.
- Al borde de cada tubo colocar arandelas de caucho.
- Moler por 20 segundos en la trituradora (Fast prep). Repetir dos veces.
- Incubar las muestras por 45 minutos a 65 °C. Agitar los tubos después de 5 minutos del inicio de la incubación, repetir al menos 3 veces. Posteriormente, agitarlos 2 veces cada 20 minutos.
- Retirar las muestras de la incubadora y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Separación de polisacáridos y proteínas

- Agregar 750 µl de Cloroformo : Alcohol Isoamílico (24:1)
- Agitar los microtubos suavemente hasta que el contenido este homogenizado.
- Centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm.
- Transferir el sobrenadante (aprox. 650 µl) a microtubos esterilizados de 1.5 mL.
- Agregar 70 µl de CTAB 10 X y agitar hasta homogenizar.
- Agregar 650 µl de Cloroformo : Alcohol Isoamílico (24:1) y agitar hasta homogenizar completamente.
- Centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm.

- Transferir el sobrenadante (aprox. 550 µl) a microtubos de 1.5 ml esterilizados. Este paso determinará la calidad de ADN a obtener.

Precipitación de ácidos nucleicos

- Agregar 500 µl de Isopropanol frío y agitar suavemente por 10 segundos.
- Incubar 30 minutos a -20°C. En este momento se puede detener el procedimiento hasta el día siguiente.
- Centrifugar 20 minutos a 14 000 rpm.
- Decantar el Isopropanol teniendo cuidado de no perder el pellet.
- Dejar los tubos invertidos por 1 minuto sobre papel toalla.

Purificación de ácidos nucleicos

- Agregar 100 µl de Etanol al 70%, desprender el pellet de la base del microtubo y dejar por 15 minutos.
- Decantar con cuidado para no perder el pellet.
- Dejar los microtubos invertidos por 30 segundos sobre papel toalla.
- Agregar 100 µl de Etanol al 90%, desprender el pellet de la base y dejar por 10 segundos.
- Decantar con cuidado para no perder el pellet.
- Dejar los tubos invertidos por 10 segundos sobre papel toalla.
- Secar las muestras en el liofilizador: 10 minutos, opción “medium”.

Resuspensión de ácidos nucleicos

- Resuspender el pellet en 100 µl de T₁₀E₁.
- Dejar toda la noche a 4 °C para una total disolución del pellet.

Anexo 2
DAS-ELISA para detección de virus de plantas
Salazar y Jayasinghe, 1997

Cobertura de placas

El primer paso en esta técnica de ELISA modificado es cubrir los pocillos de la placa de microtitulación con un anticuerpo específico para el virus a identificar. Proceder como sigue:

- a) Prepara el buffer de adsorción/ cobertura (buffer carbonato).
- b) Diluir el anticuerpo específico en el buffer de adsorción a la dilución adecuada, por ejemplo: si la etiqueta de la IgG indica 1: 1000 usar 1 µl de IgG para 10 ml de buffer de cobertura. Para desarrollar la detección simultánea de todos los virus, agregar la solución adecuada de anticuerpo de cada virus a 10 ml de buffer de cobertura.
- c) Agregar 100 µl de solución de IgG a cada pocillo de la placa de microtitulación. Manipular las placas con cuidado para evitar derrames.
- d) Cubrir la placa con una pieza de cinta de enmascarar o colocarla dentro de una bolsa plástica y sellarla e incubar por 3 a 4 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- e) Después de la incubación, vaciar la placa y lavarla con PBS-Tween. Vaciar la placa y llenar los pocillos con PBS-Tween y dejar reposar por 3 minutos. Vaciar la placa. Repetir tres veces este procedimiento. El lavado elimina las IgGs que no se han adherido en los pocillos. Inspeccionar las placas después de la cobertura para asegurarse que están bien. Las placas pueden almacenarse a $-15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 mes y en caso de aplicación rutinaria de esta técnica, pueden ser preparadas con anticipación.

Preparación de muestras y llenado de placa

Las muestras son extraídas mediante maceración del tejido vegetal usando buffer de extracción fresco para obtener una dilución de 1/10 a 1/20. Por ejemplo: 4 ml \pm 0.5 ml de buffer de extracción / 0.5 g de tejido. El buffer de extracción debe ser preparado el mismo día del muestreo.

Preparar las muestras a ser analizadas como sigue:

- a) Etiquetar las bolsas para muestras con el código de barra de la muestra cuando esté disponible o identificar la muestra con identificador único sobre la bolsa de muestra con marcador indeleble.
- b) Colocar las muestras en bolsas plásticas, tomar aproximadamente 0.5 g de tejido. La forma correcta de tomar la muestra es introducir la hoja seleccionada dentro de la bolsa plástica y una vez dentro proceder a cortar el peciolo evitando el contacto directo con la planta. Esto evita la posibilidad de una contaminación cruzada por manos del operador. Como rutina, las muestras deben ser colectadas y procesadas el mismo día, sin embargo, hay algunas excepciones (llegadas de muestras con retraso, gran cantidad de muestras que sobrepasan la capacidad operativa del laboratorio, etc.), en las cuales, el proceso de muestreo puede ser hecho un día antes del procesamiento y las muestras guardadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche.
- c) Agregar $4\text{ ml} \pm 0.5\text{ ml}$ de buffer de extracción a cada bolsa y moler la muestra frotando sobre ella la boquilla de un tubo de ensayo. Evitar derrames mientras se macera la muestra. Tanto muestras positivas como negativas se deben incluir como controles y deben ser preparadas de la misma manera que el resto de muestras. Los controles positivos son colocados después de los controles negativos.
- d) Llenar los pocitos de la placa de ELISA con $100\text{ }\mu\text{l}$ de extracto de las muestras. Usar una punta para micropipeta nueva para colocar cada muestra. Usar un pocillo por cada muestra. Agregar $100\text{ }\mu\text{l}$ de los controles negativos y positivos -en este orden-, en al menos 2 pocillos/placa al final del proceso de llenado. Dos pocillos adicionales son llenados con buffer de extracción. Inspeccionar las placas después de agregar las muestras para asegurar que no ha habido errores al colocar las muestras o derrames.
- e) Sellar la placa como en los pasos anteriores e incubar en una refrigeradora estándar a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por al menos 16 horas (toda la noche). Usar la hoja de datos de ELISA para identificar el lugar de las muestras en la placa.

Lavado de placas

Después de la incubación, vaciar el contenido de la placa y luego lavar con PBS-Tween. Los controles positivos pueden ser eliminados con una pipeta Pasteur antes del lavado, de manera que se evite la posibilidad de contaminación cruzada.

Lavar la placa. Llenar los pocillos con PBS-Tween y dejar reposar por 3 minutos. Vaciar la placa. Repetir al menos tres veces este proceso. Revisar la placa después del lavado.

Nota: Este es un paso muy importante. Por lo tanto, si algún(os) pocillo(os) permanecen verdes después del lavado, repita el procedimiento dos veces más o hasta que todos los pocillos se vean completamente limpios, en caso los pocillos no quedaran bien limpios, es posible proceder a remover los restos de savia/debris con hisopos de algodón, sin embargo, este procedimiento debe realizarse con mucho cuidado para no dañar el complejo antígeno anticuerpo, debe usarse un hisopo diferente por cada pocillo.

Adición del conjugado

A pesar que otras enzimas pueden ser conjugadas a las moléculas de anticuerpo (IgG), la fosfatasa alcalina ha dado los mejores resultados. Para agregar el conjugado proceder como sigue:

- a) Diluir el conjugado enzimático en el buffer conjugado. Para llevar a cabo la detección simultánea de todos los virus, añadir la dilución apropiada de conjugado de cada virus a 10 ml de buffer de conjugado (por placa). Registrar la fuente del conjugado (IgG-AP) y la cantidad usada para preparar la solución de conjugado.
- b) Añadir 100 µl de la solución de conjugado conteniendo el conjugado enzima-gamaglobulina (IgG-AP) a cada pocillo. Llenar los pocillos de los bordes con buffer en caso no se coloquen muestras.
- c) Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 3 a 4 horas.
- d) Lavar las placas como se describió antes, ser cuidadoso y no permitir que el contenido de los pocillos se derrame o salpique a otro. Repetir 3 veces. El

exceso del conjugado enzimático no adherido a las partículas virales se eliminará con el lavado.

Desarrollo de la reacción

Sólo los pocillos conteniendo la enzima reaccionarán en este paso.

- a) Preparar el buffer de sustrato.
- b) Disolver una pastilla de sustrato en 10 ml de buffer de sustrato. Esta solución es llamada “solución de sustrato”. Esta solución debe ser preparada justo antes de usarla y no debe ser almacenada.
- c) Agregar 80 μ l de la solución de sustrato en cada pocillo de la placa. No detenerse hasta que haya agregado la solución a todos los pocillos de la placa.
- d) Incubar la placa a temperatura ambiente hasta que la reacción pueda ser observada visualmente (usualmente 30 a 60 minutos). En los pocillos conteniendo las muestras infectadas, la solución sustrato se tornará amarilla.

La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la concentración de virus en la muestra. Mientras más fuerte el color, mayor es la concentración de virus. Los pocillos transparentes indican que las muestras están negativas. Los controles sanos y los pocillos con buffer deben permanecer transparentes.

Registro de resultados

Las placas son leídas en un lector de placas de microtitulación a 405 nm. Los datos de la absorbancia de cada placa son registrados a los 30 y 120 minutos de reacción.

Anexo 3

Prueba chi- cuadrado para las frecuencias esperadas para el cruce CT.

	1	5	5	1	
	RRRr	RRrr	Rrrr	rrrr	total
Observado	2	84	101	30	217
Esperado	18.08	90.42	90.42	18.08	217

$\chi^2 = 23.854$. Valor $P < 0.001$. El resultado es significativo, $\alpha \leq 0.05$.

Anexo 4

Prueba chi- cuadrado para la hipótesis 1 para el cruce CT.

	5	5	1	
	RRrr	Rrrr	rrrr	total
Observado	84	101	30	215
Esperado	97.7	97.7	19.6	215

$\chi^2 = 7.551$. Valor $P = 0.023$. El resultado es significativo, $\alpha \leq 0.05$.

Anexo 5

Prueba chi- cuadrado para la hipótesis 2 para el cruce CT.

	4	5	1	
	RRrr	Rrrr	rrrr	total
Observado	84	101	30	215
Esperado	86	107.5	21.5	215

$\chi^2 = 3.8$. Valor $P = 0.15$. El resultado es no significativo, $\alpha \leq 0.05$.

Anexo 6

Prueba chi- cuadrado para las frecuencias esperadas para el cruce TL.

	1	4	1	
	RRrr	Rrrr	rrrr	total
Observado	0	136	25	161
Esperado	26.83	107.34	26.83	161

$\chi^2 = 34.607$. Valor $P < 0.001$. El resultado es significativo, $\alpha \leq 0.05$.

Anexo 7

Prueba chi- cuadrado para la hipótesis 2 para el cruce TL.

	4	1	
	Rrrr	rrrr	total
Observado	136	25	161
Esperado	128.8	32.2	161

$\chi^2 = 2.012$. Valor $P = 0.156$. El resultado es no significativo, $\alpha \leq 0.05$.
